ISSN: 1130-6009

ITEA

PRODUCCION ANIMAL

Asociación
Interprofesional
para el Desarrollo
Agrario
1996 – Vol. 92A N.º 2



ITEA

Información Técnica Económica Agraria
Revista de la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario

1996 - AÑO XXVII Vol. 92A N.º 2	**DIRECCIÓN Y REDACCIÓN** Montañana, 176 - Apartado 727 50080 ZARAGOZA	Depósito legal: Z-577-82 ISSN: 1130-6009 INO Reproducciones, S.A. Polígono Miguel Servet, nave 13 50013 Zaragoza

COMITÉ DE REDACCIÓN

DIRECTOR: Pere Albertí Lasalle
SUBDIRECTOR: Joaquín Uriarte Abad
SECRETARIOS: Serie Producción Vegetal: Eduardo Notivol Paíno
Serie Producción Animal: José Luis Alabart Álvarez
VOCALES: José Álvarez Álvarez
Joaquín Gómez Aparisi
Emilio Manrique Persiva
Clara Marín Alcalá
Juan A. Marín Velázquez
Luis Pérez Pérez
M.ª Dolores Quílez Sáez de Viteri
Michel Villalta Martín
Carlos Zaragoza Larios

JUNTA DIRECTIVA DE A.I.D.A.

PRESIDENTE: Leonardo Plana Claver
VICEPRESIDENTES: 1.º Beatriz Amorena Zalbaza
2.º Rafael Socias i Company
SECRETARIO: José Álvarez Álvarez
TESORERO: Joaquín Uriarte Abad
VOCALES: José Folch Pera
Miguel Cambra Álvarez
Ricardo Revilla Delgado
Joaquín Gómez Aparisi
Gerardo Caja López
Antonio Felipe Mansergas
Emilio Manrique Persiva

Prohibida toda reproduccion total o parcial sin autorizacion expresa
de la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario

ITEA no se responsabiliza necesariamente con las opiniones en los artículos firmados
que publica, cuya responsabilidad corresponde a sus autores

Suscripciones y Distribución

Información Técnica Económica Agraria publica tres números en volumen. En 1996 se publicarán los volúmenes 92A y 92V correspondientes a las series

Producción Animal y Producción Vegetal.
El precio de la suscripción para 1996 será de 3.500 ptas. para una serie y de 5.000 ptas. para las dos series.

ITEA. Apartado 727. 50080 Zaragoza

ITEA

Información Técnica Económica Agraria
Revista de la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario

1996 - AÑO XXVII Vol. 92A N.º 2	**DIRECCIÓN Y REDACCIÓN** Montañana, 176 - Apartado 727 50080 ZARAGOZA	Depósito legal: Z-577-82 ISSN: 1130-6009 INO Reproducciones, S.A. Polígono Miguel Servet, nave 13 50013 Zaragoza

COMITÉ DE REDACCIÓN

DIRECTOR: Pere Albertí Lasalle
SUBDIRECTOR: Joaquín Uriarte Abad
SECRETARIOS: Serie Producción Vegetal: Eduardo Notivol Paino
Serie Producción Animal: José Luis Alabart Álvarez
VOCALES: José Álvarez Álvarez
Joaquín Gómez Aparisi
Emilio Manrique Persiva
Clara Marín Alcalá
Juan A. Marín Velázquez
Luis Pérez Pérez
M.ª Dolores Quílez Sáez de Viteri
Michel Villalta Martín
Carlos Zaragoza Larios

JUNTA DIRECTIVA DE A.I.D.A.

PRESIDENTE: Leonardo Plana Claver
VICEPRESIDENTES: 1.º Beatriz Amorena Zalbaza
2.º Rafael Socias i Company
SECRETARIO: José Álvarez Álvarez
TESORERO: Joaquín Uriarte Abad
VOCALES: José Folch Pera
Miguel Cambra Álvarez
Ricardo Revilla Delgado
Joaquín Gómez Aparisi
Gerardo Caja López
Antonio Felipe Mansergas
Emilio Manrique Persiva

Prohibida toda reproducción total o parcial sin autorización expresa
de la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario

ITEA no se responsabiliza necesariamente con las opiniones en los artículos firmados
que publica, cuya responsabilidad corresponde a sus autores

Suscripciones y Distribución

Información Técnica Económica Agraria publica tres números en volumen. En 1996 se publicarán los volúmenes 92A y 92V correspondientes a las series

Producción Animal y Producción Vegetal.
El precio de la suscripción para 1996 será de 3.500 ptas. para una serie y de 5.000 ptas. para las dos series.

ITEA. Apartado 727. 50080 Zaragoza

ITEA

VII JORNADAS SOBRE PRODUCCIÓN ANIMAL

ASOCIACIÓN INTERPROFESIONAL PARA EL DESARROLLO AGRARIO (AIDA)

AIDA tiene previsto la celebración en Zaragoza, durante los días 20, 21 y 22 de mayo de 1997 sus próximas Jornadas sobre Producción Animal.

Habrá una sesión científica en la que el ponente invitado tratará sobre *"Las encefalopatías bovina y ovina y sus repercusiones socio-económicas"*.

Las comunicaciones se agruparán en las siguientes sesiones:

- Genética
- Reproducción
- Nutrición - Alimentación
- Sistemas de Producción
- Patología
- Gestión - Economía
- Calidad de la carne y de otros productos

Próximamente se enviará el Programa detallado.

Las normas para la presentación de los trabajos así como cualquier tipo de información sobre hoteles y medios de transporte. puede consultarse a:

SECRETARIO:

Dr. Ignacio Delgado Enguita
Unidad de Tecnología en Producción Animal
Apdo. 727 50080 ZARAGOZA ESPAÑA
Teléfono: (9)76 - 57 63 36
Fax: (9)76 - 57 55 01
E Mail: IDELGADO@mizar.csic.es

SECRETARÍA DE AIDA:

Dña. Mercedes Ferruz
Apdo. 727 50080 ZARAGOZA ESPAÑA
Teléfono: (9)76 - 57 63 11
Fax: (9)76 - 57 55 01

ITEA (1996). Vol. 92A N.º 2. 53-66

EVALUACIÓN DE VACUNAS FRENTE A LAS MASTITIS ESTAFILOCÓCICAS DEL GANADO VACUNO LECHERO EN CONDICIONES DE EXPLOTACIÓN COMERCIAL: PROBLEMÁTICA ENCONTRADA

B. Amorena*
M. Pérez*
E. Gracia*,**
C. Rota*
R. Baselga*,**
I. Albizu*,**
J. L. Alabart*
J. M. Hernandorena***
M. J. Pascual***
J. Ocáriz***
J. Marco****

* CSIC-Servicio de Investigación Agraria
Gobierno de Aragón, Aptdo. 727
50007 Zaragoza

** Dirección actual:
Exopol, S.L. (autovacunas)
María de Luna 11, 50015 Zaragoza

*** Ctra. del Sadar S/N. Edificio El Sario
31006 Pamplona

**** Servicio de Investigación y Mejora Agraria
Gobierno Vasco. Derio (Vizcaya)

RESUMEN

Se ha realizado un estudio preliminar para evaluar, en condiciones naturales de explotación comercial, el efecto de una vacuna frente a mastitis estafilocócica sobre el recuento de células somáticas (RCS = número de células somáticas por mililitro de leche, indicador indirecto de infección bacteriana mamaria), y sobre la producción de leche (kg de leche/día), la cual es menor en animales mastíticos. Se utilizaron en el estudio 132 vacas de raza Frisona de Navarra pertenecientes a cuatro explotaciones, comprendiendo el estudio un total de 982 muestras de leche, recogidas durante los cinco meses anteriores y cinco meses posteriores al mes de la primera vacunación. La revacunación se realizó a los dos meses tras la primera vacunación. Se observó en el grupo vacunado respecto del grupo control un aumento del 17,8% ($P < 0.05$) en la proporción de animales con un RCS menor en el período post-vacunal (5 meses) que en el período pre-vacunal (5 meses). También se observó que dichos animales vacunados presentaban en el mencionado período post-vacunal un RCS menor (20.6% de reducción: $P < 0.05$) y una producción de leche mayor (6,1% de incremento: $P < 0,05$) respecto del grupo control, lo cual significa que el beneficio económico de la vacuna sería de

13 veces mayor que su coste. Se ha analizado también en este trabajo la problemática encontrada al realizar la evaluación de vacunas en condiciones de explotación comercial.

Palabras clave: Vacuna, Mastitis, *Staphylococcu*, Células somáticas, Producción leche

SUMMARY

EVALUATION OF VACCINES AGAINST STAPHYLOCOCCAL MASTITIS IN DAIRY CATTLE UNDER COMMERCIAL FARM CONDITIONS: PROBLEMS INVOLVED

A preliminary study was carried out to evaluate the effect of a staphylococcal mastitis vaccine on somatic cell count (SCC = number of somatic cells per mililiter of milk, an indirect indicator of mammary gland bacterial infection), and on milk production (kg of milk/day, known to decrease in animals with mastitis) under natural conditions in commercial farms. A total of 132 cows of the Navarra Holstein-Friesian breed were used. They belonged to four farms. A total of 982 milk samples, collected from these animals five months before and five months after the month of vaccination were involved in the study. Animals were boostered two months after the first vaccination. When compared with the control group, the vaccinated group had an increase of 17.8% ($P < 0.05$) in the proportion of animals which presented a lower RCS in the 5 months following vaccination than in the 5 months before vaccination. Also, vaccinated animals had in the 5 months following vaccination a lower RCS (20.6% reduction; $P < 0.05$) and a higher milk production (6.1% increment; $P < 0.05$) in relation to the control group, meaning that the economic benefit of the vaccine may be 13 times higher than the cost. The problems found when carrying out the study under the mentioned farm conditions were also analysed in this study.

Key words: Vaccine . Mastitis, *Staphylococcus*, Somatic cells, Milk production.

Introduccion

La mastitis, especialmente la mastitis subclínica, es la causa de graves pérdidas económicas en razas vacunas lecheras (ZORRAQUINO, 1986; KLEINSCHROTH *et al.*, 1990; HUNT y ANDERSON, 1993). La enfermedad es etiológicamente compleja y está causada primordialmente por bacterias de los géneros *Streptococcus, Escherichia* y *Staphylococcus* (POUTREL, 1985; HUNT y ANDERSON, 1993). La mastitis estreptocócica ha sido generalmente controlada por antibioterapia, existiendo pocos trabajos sobre vacunación al respecto (MACKIE *et al.*, 1983; RAINARD, 1992; TYLER *et al.*, 1992). Sin embargo, la aparición de resistencias a antibióticos, en el caso de las mastitis colibacilares y de las estafilocócicas, ha llevado al desarrollo de distintas vacunas en ambos casos. Las vacunas frente a *Escherichia coli* han sido desarrolladas ampliamente, llegándose a conseguir una vacuna elaborada con una cepa rugosa (r_e J5-TC), que carece de una serie de enzimas necesarios para una correcta síntesis de la pared, pero está provista de una región molecular común a distintas cepas capaz de conferir inmunidad

frente a ellas (CULLOR, 1991; HUNT y ANDERSON, 1993).

También se ha realizado un esfuerzo considerable en el campo de las vacunas frente a estafilococos. Inicialmente, las vacunas estafilocócicas se hallaban compuestas por toxina alfa o hemolisina beta, determinadas proteínas de la superficie bacteriana (proteína A) y/o bacterias inactivadas de distintas especies estafilocócicas, con resultados poco alentadores en muchos casos (BROCK *et al.*, 1975; ADLAM *et al.*, 1977; GUIDRY *et al.*, 1980; WATSON, 1984; YOSHIDA *et al.*, 1984; PANKEY *et al.*, 1985; FROST y MATTILA, 1988; GREENBERG *et al.*, 1989). Dado que algunas de estas vacunas parecían moderar la gravedad de la mastitis clínica pero no controlaban la crónica, últimamente los esfuerzos se han centrado en encontrar componentes moleculares del estafilococo relacionados con la cronicidad y que mejoren la eficacia de la vacuna (FOSTER, 1991).

A la hora de elegir nuevos componentes moleculares, conviene recordar que la fagocitosis es el mecanismo más importante de defensa inmunológica en la gándula mamaria. Dado que los estafilococos aislados de mastitis producen frecuentemente exopolisacáridos (FOSTER, 1991) que dificultan la fagocitosis de bacterias opsonizadas con anticuerpos frente a los componentes de la pared celular y parecen favorecer la colonización (BASELGA *et al.*, 1993, 1994), se utilizan en las nuevas vacunas bacterias rodeadas de exopolisacárido (YOSHIDA *et al.*, 1984; WATSON, 1988; WATSON, 1992), con resultados esperanzadores. Asimismo, se ha enriquecido el componente vacunal con exopolisacárido aislado de *Staphylococcus aureus* (el más patógeno de los estafilococos y frecuentemente asociado a la cronicidad en las mastitis bovinas). Debido a que la inmunopotencia de esta especie molecular es muy reducida, se ha incrementado su potencia inmunológica, uniéndola covalentemente a una proteína transportadora (FATTOM *et al.* 1992.; GILBERT *et al.*, 1993) o incluyéndola en liposomas (AMORENA *et al.*, 1994; patente Nº de Registro: 9200223), obteniéndose en este último caso unos resultados positivos en la infección experimental y moderadamente positivos a nivel de campo frente a mastitis estafilocócica en ganado ovino (MARCO, 1994). El correspondiente inóculo vacunal consiste, por un lado, en exopolisacáridos de *S. aureus* incluidos en liposomas; y, por otro lado, en la siguiente mezcla: un toxoide (sobrenadante formalinizado de un cultivo de S. aureus) y bacterias inactivadas adyuvantadas (de la especie *S. aureus* y una especie coagulasa-negativa).

Los efectos beneficiosos producidos por una vacuna pueden evaluarse considerando, tanto en las infecciones experimentales como en las naturales, algunos de los siguientes aspectos: 1) los de tipo inmunológico (duración de la respuesta humoral, clase y subclase de inmunoglobulina producida); 2) los que conciernen a la leche (la producción lechera y la calidad de la leche con referencia a proporción de grasa, proteína, lactosa y extracto seco); 3) los que atañen al desarrollo y salud del recién nacido (ganancia media diaria, etc.; WATSON, 1984, 1988); y 4) los que indican la tasa de nuevas infecciones o la prevalencia de la infección mastítica, la cual puede estimarse directamente mediante examen bacteriológico o indirectamente, mediante el recuento de las células somáticas (RCS) en leche, ya que los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) aumentan considerablemente en la leche de una vaca mastítica, lo cual les permite fagocitar las bacterias y paliar la infección.

Antes de realizar una evaluación definitiva en condiciones de explotación comercial

en la especie bovina con una vacuna frente a mastitis estafilocócica adecuada a dicha especie, se decidió realizar una evaluación preliminar y, a su vez, estudiar mediante el presente trabajo la problemática encontrada al realizar la evaluación en dichas condiciones. El objeto de este estudio es, por un lado, determinar si la vacuna ya ensayada en ganado ovino (AMORENA *et al.*, 1994) es inocua (carece de efecto tóxico) en ganado bovino y, por otro lado, averiguar con dicha vacuna o con una vacuna carente de toxicidad qué efectos se observarían sobre la producción y el RCS cuando se vacunan los animales de una explotación y cuáles serían las condiciones idóneas para poder evaluar el efecto de dicha vacuna en cuanto a las características de los animales a utilizar y el tratamiento estadístico de los datos. Considerando que en explotaciones de ganado bovino tales como las participantes en el control de producciones realizado por el Instituto Técnico y de Gestión de Vacuno de Navarra (ITGV) se dispone de los valores de RCS de cada animal a lo largo de las distintas lactaciones así como de los datos productivos (cantidad y calidad de la leche), para este estudio se utilizó dicha información, obtenida en ganaderías vacunas de raza Frisona de Navarra.

Material y métodos

El estudio se llevó a cabo en explotaciones de bovino de raza Frisona de Navarra. En cada una de ellas, se establecieron 2 grupos (vacunado y no vacunado). Se intentó distribuir los animales en ambos grupos de forma homogénea, según el estado microbiológico de la mama (primer criterio, estableciéndose distintos coeficientes: 0 = no infección; 1 = infección por *Staphylococcus aureus*; 2 = infección por otros estafilococos; 3 = infección por otro microorganismo), el recuento de células somáticas (RCS; segundo criterio, con coeficientes de 1 a 4, ordenados de menor a mayor RCS) y la edad del animal (animales de un parto frente a animales de dos o más partos).

En las explotaciones colaboradoras existían, en principio, suficientes animales infectados para que contagiaran a otros. En caso de ser eficaz, la vacuna debería proteger a los animales candidatos a contagio (menor número o gravedad de la infección), reducir el RCS y aumentar la producción en estos animales frente a los no vacunados. Sin embargo, éramos conscientes de las dificultades que conlleva realizar un estudio de esta naturaleza a nivel de rebaños comerciales. La gran variabilidad en niveles productivos y de RCS entre animales, la presencia de infecciones debidas a distintos géneros bacterianos, las diferencias en condiciones de manejo higiénico y de ordeño entre rebaños, así como el uso de animales en fases productivas muy distintas, podían dificultar la observación de un efecto neto de la vacuna, tanto en este estudio como en la observación que el ganadero puede realizar con los datos que le son fácilmente asequibles.

La vacunación y el recuerdo se realizaron por vía intramuscular, con un intervalo de 60 días. En primer lugar, se vacunaron dos de las explotaciones (explotaciones E y F con 82 y 74 animales, respectivamente) con los inóculos especificados en la patente mencionada (Nº de Registro: 9200223).

Considerando los resultados sobre inocuidad obtenidos (véase apartado de resultados correspondiente), se decidió para las 4 explotaciones restantes, eliminar el toxoide del inóculo vacunal. Asimismo, se sustituyó el adyuvante sulfato de dextrano de la vacu-

na original por hidróxido de aluminio, quedando los demás componentes vacunales inalterados en cuanto a su composición, calidad y cantidad por vacuna. Así, la vacuna modificada (que constaría de bacterias inactivadas + hidróxido de aluminio por un lado, y de liposomas + exopolisacárido por otro) fue aplicada a animales de otras cuatro explotaciones (A, B, C y D), las cuales suponían un total de 291 animales. Las explotaciones B y C fueron vacunadas en Junio, mientras que las explotaciones D y A lo fueron en Septiembre. Para el estudio de efectos de la vacuna referentes a producción lechera y RCS, se consideraron para cada explotación dos períodos: el pre-vacunal (que sería de 5 meses previo al mes de la primera vacunación) y el post-vacunal (que incluiría los cinco meses subsiguientes a la primera vacunación). Los resultados obtenidos en estas cuatro explotaciones fueron sometidos a análisis estadístico.

Los análisis bacteriológicos realizados antes de comenzar el ensayo revelaron una prevalencia elevada de mastitis estafilocócicas en las explotaciones objeto de estudio. Posteriormente, y considerando las limitaciones presupuestarias y la disponibilidad de información a través del control de producciones, el seguimiento de los animales implicados en el ensayo se centró en el análisis de la evolución del recuento de células somáticas por mililitro de leche (RCS) y de la producción (Kg de leche/día).

Considerando los resultados obtenidos en el estudio previo de los efectos de esta vacuna en el ganado ovino (MARCO *et al.*, 1995), se restringió el período de observación para las muestras implicadas en el análisis estadístico a 10 meses (5 previos a la primera vacunación y 5 posteriores a la misma, sin considerar el mes de vacunación). En el caso de que los efectos observados en dicho período respecto del efecto de la vacunación sobre el RCS y sobre la producción (kg de leche/día) fueran muy importantes, se procedería a ampliar el período de observación a más de 11 meses (más de 5 meses tras la vacunación). También se procedería a analizar el efecto sobre la composición de la leche en dicho caso.

Se eliminaron del estudio aquellas vacas, entre las 291 consideradas, cuyo RCS fue mayor o igual a 10^6 células somáticas/ml de leche en dos o más tomas durante el periodo comprendido entre el mes de vacunación (inclusive) y los 5 meses anteriores. Cuando la vacunación se realizó durante la lactación, todos los datos estudiados correspondieron a esa lactación. En aquellas vacas que se vacunaron durante el periodo de secado o al final de la lactación, sus datos correspondieron a dos lactaciones consecutivas (la previa y la posterior). Solo se tuvieron en cuenta aquellas vacas de las que se disponía de al menos un control anterior y otro posterior a la vacunación, dentro del periodo de estudio.

En suma, bajo las condiciones indicadas, el análisis comprendió un total de 982 controles (480 anteriores y 502 posteriores a la fecha de vacunación), procedentes de 132 vacas (63 vacunadas y 69 controles) de 4 explotaciones. Se eliminó, pues, el 54,6% de las 291 vacas inicialmente consideradas.

Los RCS se sometieron a transformación logarítmica antes de efectuar los análisis estadísticos. Para estudiar el efecto de la vacuna sobre el RCS se consideraron dos parámetros: uno cualitativo, consistente en el tanto por ciento de animales cuyo RCS medio fue menor en el periodo posterior a la vacunación que en el anterior, y otro cuantitativo, consistente en el RCS en sí (tras su transformación logarítmica). El primero (porcentaje) se comparó mediante la técnica de chi-cuadrado. Para el segundo (logaritmo

decimal de los RCS), se realizó un análisis de varianza-covarianza (ANCOVA). El modelo inicial fue el siguiente:

$$LRCS_P_{ijk} = \mu + VACU_i + MES_j + VACU*MES_{ij} + \beta*LRCS_A_{ijk} + MES\beta_j*LRCS_A_{ijk} + VACU\beta_i*LRCS_A_{ijk} + \epsilon_{ijk}$$

donde:

LRCS_P: Logaritmo decimal del recuento de células somáticas en cada muestreo mensual de cada vaca, posterior a la vacunación (variable dependiente).

μ: media general de LRCS_P

VACU: Efecto de la vacunación (2 niveles: vacunado, no vacunado)

MES: Meses tras la primera dosis vacunal (5 niveles, correspondiendo a los 5 meses consecutivos posteriores a la vacunación)

LRCS_A: Media del logaritmo decimal del recuento de células somáticas en los 5 meses anteriores a la vacunación para cada vaca (covariable)

β: Pendiente de la regresión entre LRCS_P y LRCS_A

$MES\beta_j$*LRCS_A y $VACU\beta_i$*LRCS_A: representan las interacciones entre los factores fijos MES y VACU con la covariable LRCS_A (posibilidad de heterogeneidad de pendientes)

ϵ: Error aleatorio que incluye el efecto vaca.

Los efectos VACU y MES se consideraron fijos. LRCS_A se utilizó como covariable, al objeto de corregir las diferencias iniciales que existían entre los grupos vacunado y no vacunado. Este mismo modelo se utilzó para analizar el efecto de la vacunación sobre la producción de leche (KGLECHE_P), pero sin realizar la transformación logarítmica. La media aritmética de la producción de leche en los 5 meses anteriores a la vacunación (KGLECHE_A) se utilizó como covariable para corregir las diferencias iniciales que existían entre los grupos vacunado y control. Las interacciones (entre factores fijos y entre éstos y la covariable) que no fueron estadísticamente significativas se eliminaron progresivamente del modelo hasta llegar a un modelo definitivo. Dichos análisis se realizaron mediante el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (SAS, 1989), utilizando el sumatorio de cuadrados de tipo III.

Resultados y discusión

Inocuidad de la vacuna

En las explotaciones E y F, en las que se aplicó el inóculo previamente descrito (en la patente indicada en la sección Material y Métodos), aparecieron algunas reacciones tóxicas en el momento de la inoculación, las cuales, si bien eran relativamente suaves, no eran deseables (estas reacciones no habían aparecido en la especie ovina; MARCO, 1994) y podrían influir como factor de estrés en el sistema inmunológico y en la producción de leche.

Por ello, y a la vista de experiencias anteriores descritas por diversos autores en cuanto a las reacciones anafilácticas que pueden causar diversos toxoides, se decició descartar el toxoide de la vacuna para la explotaciones A, B, C y D. Asimismo, y con el objeto de abaratar costes, se eliminó para estas últimas explotaciones el adyuvante sulfato de dextrano, sustituyéndose éste por

hidróxido de aluminio. El nuevo inóculo vacunal así obtenido no causó efectos tóxicos en ninguna de las cuatro explotaciones, por lo que se procedió a la evaluación estadística de los datos productivos y de RCS en dichas explotaciones.

Recuento de células somáticas (RCS) y producción lechera

En la Fig.1, se ilustra la evolución de la media de RCS (log10 RCS), y de la producción de leche (kg/día) a lo largo de 10 meses (5 meses previos a la primera vacunación y 5 meses posteriores a dicha vacunación), en el conjunto de las explotaciones estudiadas. Se observa una tendencia hacia un RCS inferior y una producción algo superior, en el grupo vacunado frente al no vacunado en el periodo posterior a la vacunación. Es decir, el grupo vacunado parece remontar mediante la vacunación la deficiencia que tenía durante el período pre-vacunal en cuanto a producción y estado sanitario de la mama (RCS). Asimismo, y con independencia de la vacunación, se observa en ambos grupos (vacunado y control) una tendencia a un aumento de RCS y a una disminución de producción según avanza el período de estudio, probablemente como consecuencia del efecto debido al estadío de la lactación.

En la Fig. 2, se ilustra la evolución de la media del recuento de células somáticas (log_{10} RCS), a lo largo de 10 meses (5 meses previos a la primera vacunación y 5 meses posteriores a dicha vacunación), en cada una de las explotaciones estudiadas (A, B, C y D). En general, puede concluirse que la tendencia observada en el conjunto de las explotaciones respecto del RCS fue también observada en cada una de ellas. Asimismo,

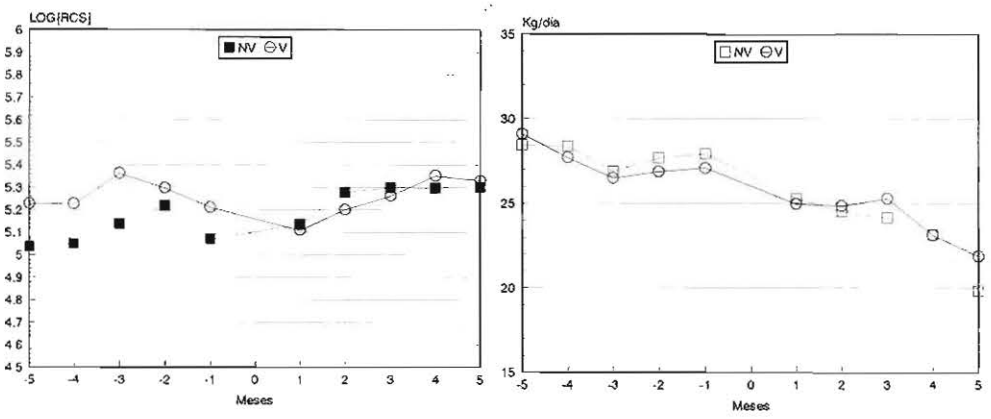


Fig. 1. Evolución de la media del recuento de células somáticas (RCS), expresado en Log10 de RCS, y de la producción de leche (kg/día) a lo largo de 10 meses (5 meses previos a la primera vacunación y 5 meses posteriores a dicha vacunación), en el conjunto de las explotaciones estudiadas. (Mes 0 = primera dosis vacunal; V = vacunado; NV = no vacunado)

Evolution of the mean somatic cell count (SCC), expressed in Log10 of SCC, and of milk production (kg/day) in a 10 month-period (5 months preceeding the first vaccination and 5 months following that vaccination), considering the farms altogether (Month 0 = first vaccine dosis; V = vaccinated; NV = not vaccinated)

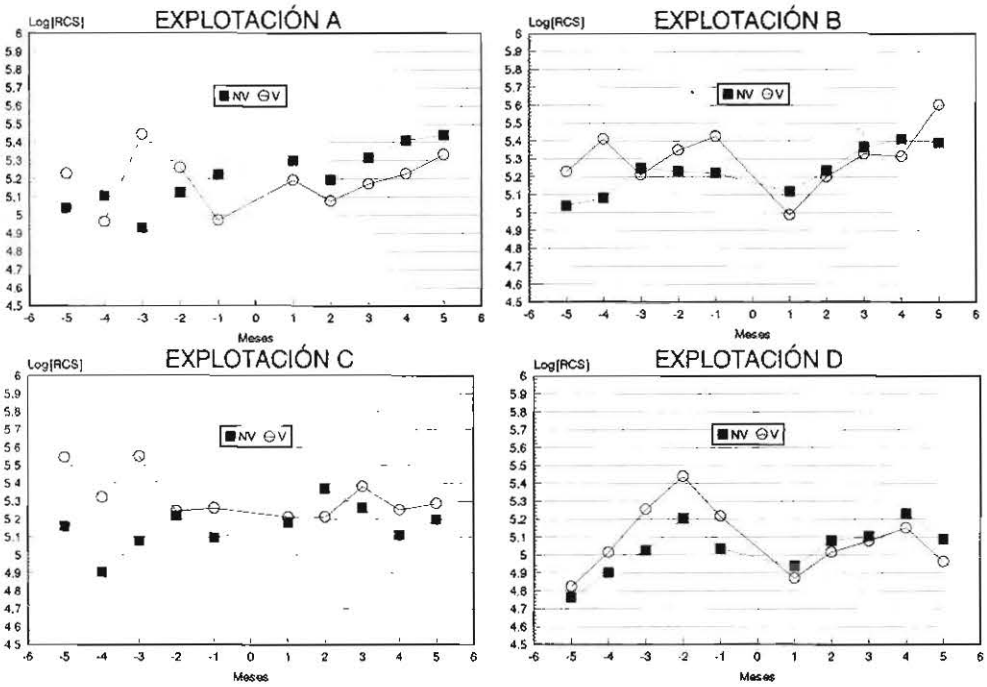


Fig. 2. Evolución de la media del recuento de células somáticas (log_{10} de RCS) a lo largo de 10 meses (5 meses previos a la primera vacunación y 5 meses posteriores a dicha vacunación), en cada una de las explotaciones estudiadas (A, B, C y D). (Mes 0 = primera vacunación; V = vacunado; NV = no vacunado)

Evolution of the mean somatic cell count (SCC), expressed in Log_{10} of SCC in a 10 month-period (5 months preceeding the first vaccination and 5 months following that vaccination), in each of the studied farms (A, B, C and D). (Month 0 = first vaccine dosis; V = vaccinated; NV = not vaccinated)

tres de las cuatro explotaciones siguen la tendencia indicada anteriormente. Solo en la explotación C deja de observarse en valores absolutos un menor número de células somáticas en el grupo vacunado respecto del grupo control durante el período post-vacunal. Ello puede deberse a que en dicha explotación el RCS era mucho más elevado en el grupo vacunal que en el grupo control durante el período pre-vacunal. La vacunación solo pudo reducir ligeramente esta diferencia en el período post-vacunal.

También se estudió la evolución de la media de la producción de leche (kg/día) a lo largo de 10 meses (5 meses previos a la primera vacunación y 5 meses posteriores a dicha vacunación) en cada una de las explotaciones estudiadas (A, B, C y D; Fig. 3). Se observa que las explotaciones siguen la tendencia mencionada de aumento de producción, especialmente tras la segunda vacunación (mes 2 tras la primera vacunación). En conclusión, al igual que el RCS, la tendencia observada en el conjunto de las explotaciones respecto de la producción fue también detectada en cada una de las explotaciones.

En las Tablas 1 y 2, se presenta un resumen de los análisis de varianza realizados. Para el RCS (LRCS_P, Tabla 1), resultaron

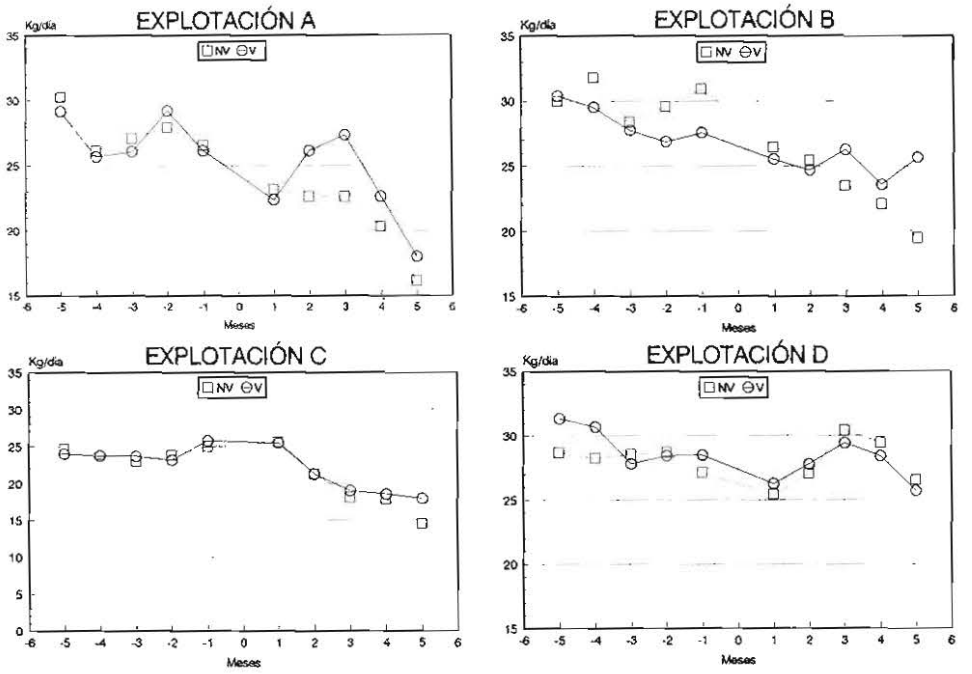


Fig. 3. Evolución de la media de la producción de leche (kg/día) a lo largo de 10 meses (5 meses previos a la primera vacunación y 5 meses posteriores a dicha vacunación), en cada una de las explotaciones estudiadas (A, B, C y D). (Mes 0 = primera dosis vacunal; V = vacunado; NV = no vacunado)

Evolution of milk production (kg/day), in a 10 month-period (5 months preceeding the first vaccination and 5 months following that vaccination), in each of the studied farms (A, B, C and D). (Month 0 = first vaccine dosis; V = vaccinated; NV = not vaccinated)

TABLA 1

RESULTADOS DEL ANCOVA PARA EL LOGARITMO DECIMAL DEL RECUENTO DE CÉLULAS SOMÁTICAS (LRCS_P) EN LOS 5 MESES POSTERIORES A LA VACUNACIÓN

TABLE 1

RESULTS OF THE ACOVA FOR THE DECIMAL LOGARITHM OF SOMATIC CELL COUNT IN THE 5 MONTHS FOLLOWING VACCINATION

Fuentes de variación	Grados de libertad	F	Significación (P<)
VACU	1	5.27	0,0221
MES	4	3.15	0,0137
LRCS_A	1	113.37	0.0001
LRCS_A*MES	4	2.48	0,0431

TABLA 2
RESULTADOS DEL ANCOVA PARA LA PRODUCCIÓN DE LECHE (KGLECHE_P) EN LOS 5 MESES POSTERIORES A LA VACUNACIÓN
TABLE 2
RESULTS OF THE ANCOVA FOR MILLK PRODUCTION (KGLECHE_P) IN THE 5 MONTHS FOLLOWING VACCINATION

Fuentes de variación	Grados de libertad	F	Significación (P<)
VACU	1	6,62	0,0104
MES	4	1,40	0,2312
KGLECHE_A	1	193,39	0,0001
KGLECHE_A*MES	4	4,89	0,0007

significativos los efectos producidos por la vacunación (VACU) y mes posterior a la vacunación (MES) así como la covariable (LRCS_A) y su interacción con el factor MES. Esto último significa que la pendiente (β) entre la variable objeto de estudio (LRCS_P) y la covariable (LRCS_A) no fue la misma a lo largo de todos los meses. No se observó interacción entre los factores VACU y MES, lo que indica que la diferencia neta de RCS entre los grupos vacunado y control fue similar para todos los meses estudiados. Tampoco hubo interacción entre el factor VACU y la covariable LRCS_A, lo que indica que la relación entre LRCS_P y LRCS_A fue similar en ambos grupos (vacunado y control).

Para la producción diaria de leche (KGLECHE_P. Tabla 2), los resultados fueron similares, a excepción de que no pudimos demostrar diferencias significativas entre meses.

Una vez corregidos los desequilibrios en RCS encontrados entre los grupos vacunado y control en el periodo anterior a la vacunación, así como los producidos por las variaciones mensuales, se observó que el efecto medio neto de la vacuna en el periodo posterior a la vacunación fue de una reducción del recuento de células somáticas del 20,6% (medias geométricas de mínimos cuadrados: 158.489 y 199.526 células/ml, para los grupos vacunado y control, respectivamente; P<0.03). En el grupo vacunado, el porcentaje de vacas con un RCS medio menor en los 5 meses posteriores a la fecha de vacunación que en los 5 anteriores fue de 54%. Sin embargo, en el grupo control esta cifra fue del 36,2% (un 17.8% inferior; P<0.05), debido probablemente a contagios de animales sanos, al agravamiento de la patología de animales subclínicamente infectados a lo largo del tiempo y/o al incremento en RCS según avanza la lactación.

Este descenso en el RCS del grupo vacunado en relación al grupo control, así como el descenso en el porcentaje de animales con RCS altos, vino acompañado de una ganancia media diaria de 1,2 Kg de leche por vaca y día a lo largo de los 5 meses posteriores a la vacunación (medias de mínimos cuadrados: 21.0 y 19.8 para los grupos vacunado y control, respectivamente: P<0,02), que representa un incremento de producción del 6,1%.

El significado biológico (con repercusión en la producción y la economía) que acompañó al efecto observado tras la vacunación parece ser muy positivo. La protección conferida por la vacuna se atribuye, en el caso de la mastitis, a que las bacterias serían mejor opsonizadas tras la vacunación, con lo cual disminuiría el número de bacterias al ser éstas mejor fagocitadas, causando con ello una menor inflamación mamaria y, como consecuencia, una mayor producción lechera.

Merece destacarse la problemática encontrada al intentar demostrar un efecto de esta vacuna en condiciones de campo. De hecho, se hizo imprescindible tener en cuenta tanto los valores medios de RCS y producción de cada vaca previos a la vacunación, como el efecto de variación mensual, para corregir los datos de RCS y producción posteriores a la vacunación. Sin estas correcciones no se hubiera podido demostrar la significación estadística del efecto de la vacuna sobre los parámetros estudiados.

Las condiciones en las que se realizó la experiencia conllevaban: la presencia de elevado RCS y menor producción en animales infectados previamente a la vacunación, una varianza elevada en el RCS y en la producción lechera (además de la existente propia de la capacidad productiva y fisiología del individuo), la presencia de infección debida a distintos géneros bacterianos, una sensibilización natural en algunos animales previo a la vacunación, la aplicación de la vacunación a animales en distinto mes de lactación o de secado y en distina época del año, diferencias entre animales en cuanto a condiciones higiénicas y de ordeño y en cuanto al estadío de infección y gravedad de la misma, una dificultad en la detección de crónicos y, en definitiva, una dificultad en observar un efecto neto de la vacuna.

En este sentido, conviene recordar que en mamas infectadas (por estafilococos u otras bacterias), el RCS puede ascender a varios millones de células por mililitro, especialmente si el patógeno implicado es un patógeno mayor como *S. aureus*. Por ello, tanto en los procesos agudos esporádicos como en los procesos crónicos, se observan grandes fluctuaciones de RCS entre meses (Figs. 1 y 2). Esta es una de las mayores diferencias entre la realización de un ensayo realizado en condiciones naturales de explotación, según lo especificado en el presente estudio y un ensayo de evaluación de vacuna en condiciones idóneas. En este último caso, si la disponibilidad económica lo permitiera, podría plantearse para futuros estudios el ensayo del siguiente modo: se realizarían determianciones bacteriológicas mensualmente durante el período pre-vacunal; de los animales libres de estafilococias (animales del *grupo a*) se vacunarían el 50 por ciento, quedando el otro 50 por ciento sin vacunar (animales control); todos los animales vacunados y los animales control se pondrían tras la fecha de vacunación en contacto con otros animales, todos ellos con estafilococias (animales del *grupo b*) por lo que en el período post-vacunal los animales sanos tendrían el riesgo de infectarse con estafilococos. Se liminarían del estudio los animales del grupo b, procediéndose al estudio de los animales del grupo a en el período pre-vacunal y post-vacunal.

Este planteamiento, si bien es deseable desde el punto de vista científico para determinar el efecto profiláctico de la vacuna sobre animales sanos con alto riesgo de infección, sería posiblemente inviable desde el punto de vista de la colaboración del ganadero, ya que exigiría una alteración del manejo de los animales en la explotación y en muchos casos el ganadero no se prestaría a arriesgar voluntariamente sus animales a

infecciones estafilocócicas, aun cuando se le compensara su riesgo económicamente. Específicamente, para lograr el contagio de los animales del *grupo b* habría que transgredir voluntariamente las normas de desinfección en el ordeño, permitiendo que las bacterias procedentes de animales sanos infectaran a ubres sanas por efecto reflujo en las pezoneras y que los animales con estafilococias fueran ordeñados antes de los sanos, con lo cual se vulnerarían las normas principales de manejo higiénico que se realizan para controlar la mastitis asociada al ordeño mecánico.

Posibles implicaciones económicas

Desde el punto de vista económico, en las condiciones de la experiencia, el hecho de que un animal, al estar vacunado, produzca por término medio 1,2 kg de leche adicionales diariamente durante el período post-vacunal estudiado, significaría (asumiendo un precio de 47 pts/l de leche) 8.460 pts (1,2 x 47 x 150) de beneficio por vaca en dicho período, al que habría que descontar el coste de la vacuna (asumiendo que oscila entre 150 y 250 pts por dosis, dos dosis = 500 pts, máximo por animal) y el de su aplicación (50 pts/vaca/dosis, total = 100 pts). Es decir, el beneficio neto se situaría en unas 7.860 pts, lo que supondría una relación beneficio:coste de 13:1 para los respectivos supuestos, sin contabilizar los beneficios derivados de: a) la disminución de leche penalizada por el elevado RCS, b) evitar los costes de medicamentos y de cuidados veterinarios para paliar el efecto o el establecimiento de infecciones tras la vacunación; y c) evitar resistencias a los antibióticos en las bacterias. Respecto del punto b), conviene recordar que, según se demuestra en un estudio nuestro anterior (AMORENA *et al.*, 1994), tras una infección experimental en la que se inocula un número conocido de bacterias en la mama a animales libres de infección previamente inmunizados con la vacuna anteriormente descrita por este grupo, se observa un efecto protector de dicha vacuna importante, disminuyendo la gravedad de la mastitis y su prevalencia.

La relación beneficio:coste mencionada, si bien habría que comprobarla con un mayor número de animales, es del mismo signo que la observada (5,2:1) en ganado ovino tras la aplicación de la vacuna análoga a la utilizada en este estudio (MARCO *et al.*, 1995). Así, en ganado ovino lechero, se ha observado que, si bien el efecto de la vacuna sobre el RCS es relativamente reducido, dicho efecto es notable sobre la producción lechera (9 litros por animal vacunado en el total del período de lactación), en la raza Latxa; así, la vacuna, además de suponer un beneficio económico considerable, según apunta MARCO (1994), representaría una vía complementaria a otras vías de control de mastitis, como son la mejora de la higiene, la regulación de la máquina de ordeño, el orden de ordeño o la aplicación de terapia al secado.

Hubiera sido deseable en este estudio la utilización de un mayor número de animales, de animales sincronizados, o que hubieran recibido la vacunación en un mismo mes de lactación o de secado, en una misma época del año y en un mismo período de lactación. Asimismo, en alguna de las explotaciones, las prácticas de higiene y ordeño necesarias para evitar la mastitis (por ejemplo, la desinfección de pezones) no se realizaron correctamente, favoreciendo el paso de gérmenes entre ubres de manera incontrolada e impredecible. Sin embargo, las condiciones en que se realizó la experiencia impidieron aplicar la sincronización, el manejo y las prácticas higénicas de manera generalizadamente idónea, con todo lo cual

la detección del efecto de la vacunación pudo verse seriamente interferida.

Conclusiones

En este estudio se evidencia la importancia de la realización de pruebas de inocuidad en la especie bovina previo a la aplicación (o a las pruebas de evaluación) de la vacuna en una explotación. También se demuestra que, cuando el estudio se realiza en las condiciones naturales de las explotaciones comerciales, sin alteración del manejo de los animales, con aprovechamiento de los datos obtenidos en el control de producciones (producción de leche y RCS) y con escasos medios, el ganadero suele prestarse con facilidad a la colaboración y pueden obtenerse datos de interés sobre el efecto de la vacuna, pero la variabilidad atribuible al RCS y a la producción de leche dificultan la observación del efecto neto de la vacuna, según los datos obtenidos en este estudio. A pesar de esta dificultad, se ha observado en este estudio preliminar que los animales vacunados presentan un menor RCS y una mayor producción, siendo rentable la vacunación a la vista del posible beneficio productivo resultante. Algunos de los problemas de variabilidad en RCS como parámetro indicador de mastitis podrían resolverse, si los medios lo permitieran, realizando un análisis bacteriológico de la leche que sustituyera a las determinaciones de RCS. Idóneamente, para poder aislar el efecto debido a la vacunación de otros efectos, la evaluación de la vacuna ha de realizarse en animales que en el momento de la vacunación estén libres de estafilococias. También, deberían utilizarse animales con unos mismos niveles de producción, en un mismo estadío de lactación, que tuvieran un mismo número de lactaciones y un mismo tipo de manejo y que, tras la vacunación, estuvieran expuestos a contagios "naturales" por estafilococos procedentes de vacas que no entrarían en el estudio. La colaboración del ganadero y la financiación de la experiencia serían los puntos decisivos para llevar a cabo este tipo de evaluación en explotaciones comerciales. De lo contrario, habría de utilizarse un gran número de animales, si han de detectarse los efectos de la vacuna a partir de los datos de RCS y producción lechera.

Agradecimientos

Financiado por INIA (proyecto Demostración PD 93-010). Agradecemos la colaboración de los ganaderos que han participado en el estudio y al ITGV de Navarra, especialmente a los equipos de dirección e informáticos, por facilitarnos los datos de producción.

Bibliografía

ADLAM C., WARD P.D., MCCARTNEY Ch., ARBUTHNOTT J.P., THORLEY C.M., 1977. Effect of immunization with highly purified alpha and beta toxins on staphylococcal mastitis in rabbits. Infection and Immunity, 17, 250-256.

AMORENA, B., ALBIZU, I., BASELGA, R., 1994. Use of liposome-immunopotentiated exopolysaccharide as a component of an ovine mastitis staphylococcal vaccine. Vaccine, 12, 243-249.

BASELGA, R., ALBIZU, I., DEL CACHO, E., BARBERÁN, M. AMORENA, B., 1993. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*, implication in colonization and virulence. Infection and Immunity, 61, 4857-4862.

BASELGA, R., ALBIZU, I., AMORENA, B., 1994. *Staphylococcus aureus* capsule and slime as virulence factors in mastitis. Veterinary Microbiology, 39, 195-204.

BROCK J.H., STELL E.D., Reiter B., 1975. The effect of intramuscular and intramammary vaccination of cows on antibody levels and resistance to intramammary infection by *Staphylococcus aureus*. Research in Veterinary Science. 19. 152-158.

CULLOR, J.S., 1991. The *Escherichia coli* J5 vaccine: Investigating a new tool to combat coliform mastitis. Veterinay Medicine. 86. 836-844.

FATTOM A., SHILOACH J., BRYLA D., FITZGERALD D., PASTAN, I., KARAKAWA, W.W., ROBBINS, J.B., SCHNEERSON, R., 1992. Comparative immunogenicity of conjugates composed of the *Staphylococcus aureus* type-8 capsular polysaccharide bound to carrier proteins by adipic acid dihydrazide or N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate. Infection and Immunity. 60. 584-589.

FOSTER, T.J., 1991. Potential for vaccination against infections caused by *Staphylococcus aureus*. Vaccine. 9. 221-227.

FROST, A.J., MAFTILA, T., 1988. The effect on inflammation of the bovine mammary gland on vaccination with a cell wall extract of *Staphylococcus aureus*. Journal of Veterinary Medicine, Series B. 35. 688-694.

GILBERT F. B., POUTREL, B., SUTRA, L. 1993. Immunogenicity of *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharide ovalbumin conjugate. Vaccine, 10, 389-394.

GREENBERG D.P., BAYER A.S., CHEUNG A.L., WARD, J.I., 1989. Protective efficacy of protein A-specific antibody against bacteremic infection due to *Staphylococcus aureus* in an infant rat model. Infection and Immunity. 57. 1113-1118.

GUIDRY, A.J., PAAPE, M.J:, PEARSON, R.E., et al., 1980. Local immunization of the mammary gland on phagocytosis and intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by polymorphonuclear neutrophils. American Journal of Veterinary Research. 41: 1427-1431.

HUNT, E., ANDERSON, K.L., 1993. Update on bovine mastitis. The Veterinay Clinics of North America. 9, 421-620

KLEINSCHROTH, E., RABOLD, K., DENEKE, J., 1990. La mastitis, diagnóstico, prevención y tratamiento. Ed. Grünland. 78 pp

MACKIE, D.P., POLLOCK, D.A., MENEELY, D.J., LOGAN, E.F., 1983. Clinical features of consecutive intramammary infections with *Streptococcus agalactiae* in vaccinated and unvaccinated heifers. Veterinary Record, 112: 472-476.

MARCO, J.C., 1994. Mastitis en la oveja Latxa: epidemiología, diagnóstico y control. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. Facultad de Veterinaria.

MARCO, J.C., ROMEO, M., ESNAL, A., GONZÁLEZ, L., AMORENA, B., 1995. Ensayo de vacunación frente a las mastitis estafilocócicas en rebaños comerciales. ITEA vol. extra Núm 16 (II): 221-223.

PANKEY J.W., BRODIE N.T., WATTS J.L., NICKERSON, S.C., 1985. Evaluation of protein A and a commercial bacterin as vaccines against *Staphylococcus aureus* mastitis by experimental challenge. Journal of Dairy Science. 68. 726-731

POUTREL, B., 1985. Généralités sur les mammites de la vache laitière. Processus infectieux, épidemiologie, diagnostic, méthode de contrôle. Recherche en Médecine Véterinaire. 161 (Num. especial) 497-511.

RAINARD, P., 1992. Isotype antibody response in cows to *Streptococcus agalactiae* group B polysaccharide ovalbumin conjugate. Journal of Clinical Microbiology, 30, 1856-1862.

SAS, 1989. SAS Institute Inc., SAS/STAT User's Guide. Fouth Edition, 4th printing, June 1994. Volume 2, SAS Institute Inc.,Cary, North Carolina 846 pp.

TYLER, J.W., SPEARS, H., NELSON, R., 1992. Antigenic homology of endotoxin with a coliform mastitis vaccine strain. *Escherichia coli* 0111 - B4 (J5). Journal of Dairy Science 75. 1821-1825.

WATSON D L., 1984. Evaluation of attenuated, live staphylococcal vaccine in lactating heifers. Journal of Dairy Science 67. 2608-2613.

WATSON, D.L., 1988 Vaccination against experimental staphylococcal mastitis in ewes. Research in Veterinary Science. 45. 16-21.

YOSHIDA, K. ICHIMAN, Y., NARIKAWA, S. et al., 1984. Staphylococcal capsular vaccine for preventing mastitis in two herds in Georgia. Journal of Dairy Science, 67. 620-627.

ZORRAQUINO, M.A. (1986) Mamitis. Bovis. núms. 10 y 11.E. Luzán. Madrid. España.

(Aceptado para publicación el 7 de marzo de 1996)

ITEA (1996), Vol. 92A N.º 2, 67-75

LA NEOSPOROSIS EN ANIMALES DOMÉSTICOS

T. Sáez Gutiérrez
M.C. Marca Andrés
M.C. Sanz Lorenzo
J.J. Ramos Antón

Dpto. Patología Animal
(Patología General y Médica)
Facultad de Veterinaria
C/ Miguel Servet 177
50013 ZARAGOZA

RESUMEN

Neospora caninum es un protozoo parásito recientemente identificado y que afecta a los animales domésticos. Hasta 1988 era diagnosticado como *Toxoplasma gondii*. *Neospora caninum* es capaz de producir parálisis y muerte en perros y mortalidad neonatal y abortos en vacas, ovejas, cabras y caballos.

Palabaras clave: *Neospora caninum, Toxoplasma gondii,* animales domésticos.

SUMMARY
NEOSPOROSIS IN DOMESTIC ANIMALS

Neospora caninum is a recently recognized protozoan parasite of animals which until 1988 was diagnosed as *Toxoplasma gondii*. *Neospora caninum* causes paralysis and death in dogs and neonatal mortality and abortion in cattle, sheep, goats and horses.

Key words: *Neospora caninum, Toxoplasma gondii,* domestic animals.

Introducción

En 1984, en Noruega se diagnosticó una enfermedad nerviosa en perros que parecía estar asociada a un parásito similar a *T. gondii* (BJERKAS *et al.*, 1984). Dicho parásito se detectó en cerebro y músculos y sin embargo no se hallaron anticuerpos frente a *T. gondii*. En 1988, un parásito similar fue encontrado en 10 perros en EEUU y a este parásito canino se le denominó *Neospora caninum* (DUBEY *et al.*, 1988). Sin embargo la neosporosis no es un hallazgo nuevo ya que estudios retrospectivos muestran que en 1957 un grupo de perros de EEUU desarrollaron una grave enfermedad debida probablemente a *N. caninum* (DUBEY y LINDSAY, 1993). Años más tarde, en 1988, taquizoitos vivos de *N. caninum* fueron aislados en cultivos celulares y se observaron quistes tisulares en ratones inoculados con tejidos de perros infestados. La neosporosis se indujo experimentalmente en perros infestados con

taquizoitos y se desarrolló el test de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para detectar anticuerpos frente a *N. caninum*. El desarrollo de técnicas immunohistoquímicas en 1989 llevaron a la identificación del parásito en tejidos fijados con formol, lo que ha hecho posible el diagnóstico de infecciones por Neospora en un amplio número de animales (LINDSAY y DUBEY, 1989-a). En 1991, la estructura y antigenicidad del parásito procedente de perros de Noruega y EEUU se comparó concluyendo que se trataba del mismo parásito, *N. caninum*.

Posteriormente la neosporosis se ha diagnosticado como causa de aborto en ganado vacuno y también se han publicado casos de neosporosis en cabras, ovejas y caballos. Sin embargo, la incidencia de la neosporosis en estos animales aún no se ha determinado, ni tampoco se conoce la prevalencia y la importancia económica de esta enfermedad.

Hasta el momento se han realizado 2 aislamientos de *Neospora*, uno en un feto bovino y otro en un perro. Sin embargo las diferencias antigénicas entre ambos son muy escasas. Los taquizoitos de ambos aislamientos son muy similares, sólo existen pequeñas diferencias en los quistes tisulares (LINDSAY *et al.*, 1993; CONRAD *et al.*, 1993).

Estructura

El parásito *N. caninum* se encuentra dentro del phylum Apicomplexa familia Sarcocystidae junto con los géneros *Toxoplasma*, *Sarcocystis* y *Hammondia* (HOLMDAHL *et al.*, 1994).

Aunque clínicamente neosporosis y toxoplasmosis son parecidas, *T. gondii* y *N. caninum* son distintos antigénica y estructuralmente. A microscopia óptica los taquizoitos de *N. caninum* y *T. gondii* pueden parecer idénticos, sin embargo a microscopia electrónica de transmisión las roptrias en *N. caninum* aparecen electrodensas mientras que en *T. gondii* son esponjosas (DUBEY *et al.*, 1988).

Los taquizoitos tienen forma ovoide o globular y miden de 3-7 x 1-5 µm, dependiendo de su estado de división. Se dividen en 2 zoitos por endodiogenia. En animales infectados, los taquizoitos se encuentran en diferentes células: nerviosas, macrófagos, fibroblastos, células del endotelio vascular, miocitos, células epiteliales de los túbulos renales y hepatocitos (DUBEY *et al.*, 1988; DUBEY y LINDSAY, 1993). Los taquizoitos se localizan en el citoplasma de las células con o sin vacuola parasitófora, presentando organelas típicas de *T. gondii* y de otros coccidios.

Los quistes tisulares tienen forma oval, miden más de 107 µm de largo y se encuentran sólo en tejido nervioso (cerebro, médula espinal) y retina (DUBEY *et al.*, 1988; DUBEY y LINDSAY, 1993). La pared del quiste es lisa y mide unos 4 µm de espesor. Los bradizoitos son delgados (6-8 x 1-1,8 µm) y contienen las mismas organelas que los taquizoitos excepto que tienen menos roptrias y los gránulos son más PAS + en los bradizoitos. En los quistes aparecen estructuras tubulares entre los bradizoitos que contienen microporos (BJERKAS, y PRESTUS, 1988). Los microporos se han observado en bradizoitos de quistes tisulares de perros de Noruega mientras que en perros de EEUU no se han encontrado (SPEER y DUBEY, 1989).

N. caninum inicialmente se ha cultivado *in vitro* en monocitos bovinos y células endoteliales de arteria cardiopulmonar. Al mismo tiempo *N. caninum* también se ha logrado cultivar en células de riñón bovino Madin-Darby, en fibroblastos de piel huma-

na y en otras líneas celulares de cerebro fetal de ratón. El efecto citopático se observa sobre todo a los 3 días postinfección y consiste principalmente en la ruptura de las células produciendo agujeros en la monocapa de cultivo. A los 4-6 días postinfección se ha destruído aproximadamente el 70% de las células de cultivo. En estos cultivos sólo se obtienen taquizoitos que son infectivos para los animales. El pase continuado de taquizoitos en cultivos celulares se ha mantenido durante años sin pérdida de infectividad. Asimismo, los taquizoitos en nitrógeno líquido siguen siendo infectivos para los cultivos celulares (LINDSAY y DUBEY, 1989-b).

Epidemiología

Hasta el momento no se conoce el ciclo de *N. caninum,* únicamente se ha demostrado la transmisión vertical de la madre al feto (DUBEY, 1992). La infección experimental se ha inducido en ratas, ratones, perros, gatos, ovejas, vacas (DUBEY y LINDSAY, 1993; BARR *et al.*, 1994) y cabras (BUXTON, comunicación personal). Asimismo, la infección puede tener lugar en el mismo animal repetidamente (DUBEY y LINDSAY, 1993).

La similitud entre *N. caninum* y *T. gondii* sugiere que se trata de un coccidio con un carnívoro como hospedado definitivo. De su ciclo biológico sólo se han identificado taquizoitos y quistes. Sin embargo no se han detectado ooquistes en heces de perros, gatos o mapaches infectados experimentalmente con *N. caninum.*

En unos días, *N. caninum* es capaz de producir lesiones necróticas causando la muerte celular por la multiplicación activa de los taquizoitos. Asimismo, puede producir una enfermedad neuromuscular grave en perros y probablemente en otros hospedadores destruyendo gran variedad de células nerviosas, incluyendo los nervios espinal y craneal y alterando la conductividad de las células afectadas (DUBEY y LINDSAY, 1993).

Generalmente, los quistes tisulares no están rodeados por una zona de reacción del hospedador. No obstante, la formación de granulomas alrededor de algunos quistes tisulares y bradizoitos sugiere que algunos quistes se pueden romper causando una reacción de inflamación por parte del hospedador. Asimismo, la administración de corticoides exógenos puede exacerbar la neosporosis. Por otra parte, aunque no se conoce por cuánto tiempo los quistes tisulares pueden permanecer en el sistema nervioso central; experimentalmente se ha comprobado en ratones que pueden ser viables durante al menos 1 año (DUBEY y LINDSAY, 1993).

En animales inoculados experimentalmente, *N. caninum* es infectivo por vía subcutánea, intraperitoneal, intramuscular e incluso por via oral (DUBEY y LINDSAY, 1993). Los bradizoitos de los quistes tisulares son resistentes al HCl y la pepsina, lo cual indica que los carnívoros pueden formar parte del ciclo biológico de *N. caninum.* También se ha comprobado que los quistes tisulares de *N. caninum* pueden sobrevivir durante más de 14 días a 4 °C, pero no son infectivos después de una incubación a -20 °C durante 1 día (DUBEY y LINDSAY, 1993). Estos mismos autores recogieron taquizoitos de *Neospora* de ratones inoculados con tejido nervioso de un ternero aun cuando la muestra había permanecido durante 4 meses a -52 °C antes de ser inoculada.

En gatos, la infección experimental antes de la gestación dió lugar a una infección congénita en los cachorros, al mismo tiempo que se encontraron taquizoitos en la pla-

centa y el útero de la madre (DUBEY y LINDSAY, 1993).

N. caninum no produce infección en roedores inmunocompetentes. Una alternativa para producir la infección en ratones es provocarles inmunosupresión con corticosteroides. Dependiendo del grado de infección y la dosis de corticosteroides se puede producir infección experimental e incluso ser más patogeno para los ratones que para otras especies. La neumonía y la encefalitis son los signos predominantes de la neosporosis en ratones mientras que las ratas suelen desarrollar hepatitis. El número de quistes tisulares producidos es impredecible. Estos, son mucho más pequeños (10-15 µm) en ratones que en perros infectados por vía natural (DUBEY y LINDSAY, 1993).

N. caninum como agente causal de abortos

En ganado vacuno, los abortos son el síntoma más característico de Neosporosis y éstos pueden tener lugar tanto de forma esporádica, como enzoótica o epidémica originando el nacimiento de terneros débiles (NIETFELD *et al.*, 1992, DUBEY y LINDSAY, 1993). En California, el 15% de los abortos investigados fueron debidos a *N. caninum* (BARR *et al.*, 1991) y en Escocia, el 9% de las vacas que habían abortado recientemente, mostraron diferentes títulos de anticuerpos frente a *N. caninum* (TREES *et al.*, 1994). OTTER *et al.* (1995) de 190 fetos abortados o mortinatos, diagnosticaron *N. caninum* en el cerebro de 8 de ellos (4,2%). Asimismo, la Neosporosis está considerada como una de las mayores causas de aborto en Nueva Zelanda, al mismo tiempo que ha sido diagnosticada en Canadá, Europa, Australia, Sudáfrica y Japón (DUBEY y LINDSAY, 1993). Gran parte de la información disponible sobre la epidemiología de Neospora como responsable de abortos en vacas proviene de estudios realizados en ganado lechero de California. En un estudio realizado sobre 689 fetos, entre los 3 y 8 meses de gestación, se encontró neosporosis en el 24,4% (ANDERSON *et al.*, 1991).

Los abortos suelen tener lugar a partir del tercer mes de gestación con una media de edad de 5,6 meses. En los fetos, tanto el parásito como los quistes tisulares son más abundantes a finales de la gestación y también en terneros recién nacidos (ANDERSON *et al.*, 1991; BARR *et al.*; 1991), sin embargo, los taquizoitos se suelen encontrar en fetos a los 4 meses de gestación (DUBEY y LINDSAY, 1993). Asimismo, *Neospora* puede causar reabsorción fetal a principios de gestación, muerte y, en algunos casos, retención del esqueleto o de los fetos momificados hasta final de gestación. Algunos autores consideran que el hallazgo de fetos momificados es un signo clínico importante que hace sospechar de un brote de Neosporosis (TREES *et al.*, 1993).

Los terneros nacidos vivos pueden desarrollar signos neuromusculares como resultado de la infección por *Neospora*. Estos signos clínicos aparecen frecuentemente entre los 3 y 5 días de vida aunque también pueden aparecer a las 2 semanas. Los animales infectados suelen nacer con un peso más bajo de lo normal, debilidad y en ocasiones incapacidad para mantenerse en pie, ya que las extremidades pueden aparecer en extensión. No obstante actualmente, la prevalencia subclínica de la Neosporosis congénita todavía no se conoce (BARR *et al.*, 1991; DUBEY y LINDSAY, 1993).

Experimentalmente se ha comprobado que de 3 vacas inoculadas con *N. caninum*, 2 de ellas abortaron fetos momificados; la tercera fue sacrificada a los 32 días postin-

fección y el feto estaba vivo aunque presentaba una extensa necrosis tanto de la materia gris como de la blanca. En la siguiente gestación los fetos fueron normales, aunque en condiciones naturales se ha comprobado que la Neosporosis congénita puede repetirse en esta especie (BARR *et al.*, 1993).

Asimismo, ANDERSON (1992), al estudiar la prevalencia en ganado vacuno entre los años 1985-1990, observó que ésta era muy similar a lo largo de ese período, lo cual indica que no se trata de una enfermedad nueva introducida recientemente. Sin embargo, en algunas explotaciones se ha observado un brote repentino de abortos provocado por *N. caninum;* este hecho suele tener lugar en explotaciones que anteriormente no habían estado en contacto con dicho parásito (THORNTON *et al.*, 1994; YAEGER *et al.*, 1994).

En caballos, el primer caso fue diagnosticado por DUBEY y PORTERFIELD (1990) en un feto abortado 2 meses antes de la fecha prevista para el parto, lo cual indica que en équidos también es posible la transmisión transplacentaria, ya que los taquizoitos de *N. caninum* se encontraron en secciones de pulmón.

En ganado ovino, aunque no es una especie muy susceptible de padecer esta enfermedad, se diagnosticó por primera vez en un cordero de una semana de edad el cual era incapaz de mantenerse en pie. Los quistes tisulares de *N. caninum* se encontraban en cerebro y espina dorsal (DUBEY *et al.*, 1990). En cabras, se diagnosticó por primera vez a partir de cerebro de cabrito siendo la distribución de los quistes similar a la que se da en el ganado ovino (DUBEY *et al.*, 1992).

Respecto a las lesiones en fetos o mortinatos, éstas no son específicas. En los fetos abortados, las lesiones microscópicas se localizan principalmente en cerebro, espina dorsal y corazón, y ocasionalmente, en pulmones, riñones y membranas fetales (BARR *et al.*, 1991; DUBEY y LINDSAY, 1993). Las lesiones microscópicas consisten en encefalitis y miocarditis multifocal necrotizante no supurativa. Los focos de necrosis estan rodeados de células inflamatorias (de la glia o mononucleares). Asimismo, también se pueden encontrar lesiones en la placenta con infiltrados de células inflamatorias a nivel focal o intersticial (BARR *et al.*, 1992).

Neosporosis en animales de compañia

Neospora caninum se ha encontrado en perros infectados naturalmente en distintas áreas geográficas, incluyendo EEUU, Canadá, Europa, Australia, Sudáfrica y Japón. En animales jóvenes la enfermedad cursa de forma grave, sobre todo en cachorros infectados de forma congenita (HAY *et al.*, 1990; MAYHEW *et al.*, 1991; DUBEY y LINDSAY, 1993), los cuales desarrollan una parálisis ascendente, entre las 7 semanas y los 10 meses de edad, con las extremidades posteriores más gravemente afectadas, no obstante, los animales pueden vivir durante varios meses. Cuando aparecen afectados varios animales de la misma camada esto debe hacernos sospechar de neosporosis. La enfermedad puede estar localizada o generalizada en todos los órganos incluyendo la piel. Otras disfunciones incluyen dificultad para tragar, parálisis mandíbular, flacidez, atrofia muscular y finalmente fallo cardíaco (SHEAHAN *et al.*, 1993; CUDDON *et al.*, 1992).

Los valores hemáticos generalmente no estan alterados, aunque puede haber incremento de los enzimas séricos asociados con necrosis de miocitos y del hígado: CK, GPT y AP (CUDDON *et al.*, 1992; GREIG *et al.*, 1995).

No se conoce ninguna predisposición racial o susceptibilidad respecto al sexo en la Neosporosis. No obstante, el caso más grave se ha observado en 4 camadas de Pointer de un mismo dueño, en los que ve de 36 perros, 29 presentaron parálisis de las extremidades y en 6 perros necropsiados se encontró *N. caninum* (DUBEY y LINDSAY, 1993).

Más recientemente, GREIG *et al.*, 1995 describieron un caso de neumonía en un perro adulto (11 años de edad). Dicho animal había sido tratado durante 8 años con corticoides por problemas de atopia. Las radiografías mostraban una enfermedad alveolar multifocal distribuída por todo el pulmón. Al estudiar el aspirado pulmonar se observaron taquizoitos de *N. caninum*. ODIN y DUBEY (1993) citan un caso de muerte repentina en un perro de 10 meses sin signos clínicos aparentes. La necropsia del animal reveló que se trataba de miocarditis multifocal intersticial y necrosis con infiltración de linfocitos y macrófagos y unos pocos neutrófilos. Los taquizoitos se detectaron en los miocitos y entre las células inflamatorias.

Diagnóstico

Normalmente el diagnóstico de Neosporosis se hace sobre cortes histológicos con técnicas convencionales de hematoxilina/eosina y también con técnicas inmunohistoquímicas (LINDSAY y DUBEY, 1989a; ANDERSON *et al.*, 1991).

Estudios preliminares indican que muchas especies de animales desarrollan anticuerpos específicos frente a *N. caninum* los cuales se pueden detectar mediante IFI usando como antígeno taquizoitos de *N. caninum* procedentes de cultivos celulares. El título de anticuerpos a partir del cual un animal es considerado positivo a *N. caninum* es 1/200. Sin embargo, existe cierta reacción cruzada entre *N. caninum* y *T. gondii* en diluciones < 1/50. Los perros con neosporosis clínica presentan títulos ≥ 1/200, aunque perros con títulos > 1/800 pueden ser clínicamente normales (DUBEY y LINDSAY, 1993). En nuestra opinión, y según las recomendaciones del Dr. BUXTON, consideramos animales positivos a partir de la dilución 1/256.

Cuando se trata de diagnosticar Neosporosis en el ganado bovino, es preciso hacer el diagnóstico diferencial frente a *T. gondii* y *Sarcocystis spp.*, tanto en el test IFI como en las técnicas inmunohistoquímicas (LINDSAY y DUBEY, 1989a; BARR *et al.*, 1991; TREES *et al.*, 1994; OTTER *et al.*, 1995).

La técnica serológica ideal debe ser sensible, específica, (particularmente no debe haber reacción cruzada con otros parásitos como *T. gondii, Sarcocystis spp.* u otros coccidios), de bajo coste, y a ser posible automatizable, para poder analizar gran número de muestras sin invertir demasiado tiempo. El test ELISA cumple prácticamente todos estos requisitos y se está utilizando como un método rápido para detectar y titular anticuerpos frente a varios antígenos. Actualmente, el test ELISA frente a *N. caninum* no se ha desarrollado debido a la reacción cruzada frente a otros protozoos (DUBEY y LINDSAY, 1993), por lo tanto las futuras investigaciones deben ir encaminadas a desarrollar dicho test.

Mediante técnicas inmunohistoquímicas también se puede diagnosticar *N. caninum* usando suero anti. En algunos casos se utiliza suero policlonal de conejos inmunizados con taquizoitos de cultivos celulares. En ocasiones, *N. caninum* reacciona débilmente con antisueros de *T. gondii;* sin embargo,

las técnicas inmunohistoquímicas son fiables 100%. Además hay que tener en cuenta que el tipo de antígeno, el estado del parásito al inmunizar los conejos, el tratamiento con tripsina o pepsina de los tejidos o la falta de tratamiento enzimático en los mismos pueden influir sobre los resultados inmunohistoquímicos (LINDSAY y DUBEY, 1989-a). Actualmente se ha desarrollado un anticuerpo monoclonal específico para taquizoitos y quistes de *N. caninum* (COLE *et al.*, 1993).

Tratamiento y profilaxis

Inicialmente algunos fármacos empleados en el tratamiento de la Toxoplasmosis se han testado en cultivos celulares de *N. caninum* (Lindsay *et al.*, 1994). Lasalocid, monensina, piretrezim, pirimetamina y trimetroprin previenen la multiplicación intracelular de *N. caninum*. Asimismo, la sulfadiazina en el agua de bebida previene la Neosporosis clínica en ratones infectados experimentalmente, pero su administración no es efectiva una vez que los signos clínicos han aparecido (DUBEY y LINDSAY, 1993).

En perros, siempre que el diagnóstico sea precoz, se pueden utilizar como tratamiento sulfadiazina/trimetoprin (15 mg/kg 2 veces al día) y pirimetamina (1 mg/kg diariamente), aunque ninguno de estos fármacos es efectivo en animales con parálisis o rigidez de extremidades (HAY *et al.*, 1990; MAYHEW *et àl.*, 1991). El tratamiento con clindamicina (13,5 mg/kg 3 veces al día) dió resultado en un perro con miositis y diagnosticado de neosporosis (DUBEY y LINDSAY, 1993). Igualmente DUBEY *et al.*, (1995), al tratar con clindamicina a un perro con neosporosis la cual cursaba con dermatitis piogranulomatosa, resolvieron las lesiones cutáneas a los 45 días del tratamiento.

Respecto a la profilaxis poco se puede decir, puesto que el ciclo del parásito aún no se conoce. En los países en que ya ha sido diagnosticada la enfermedad la única medida que se está llevando a cabo es el control de los animales positivos.

Agradecimientos

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a una ayuda de investigación CAI-CONAI concedida en Noviembre de 1994.

Bibliografía

ANDERSON, M.L., BLANCHARD, P.C. y BARR, B.C. 1991. Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. JAVMA, 198, 241-244.

ANDERSON, M.L. 1992. XVII Buitrics Congress and XXV American Association of Bovine Practicioners Conference. St. Paul, USA.

BARR, B.C., ANDERSON, M.L., DUBEY, J.P. y CONRAD, P.A. 1991. Neospora-like protozoal infectious associated with bovine abortions. Vet. Pathol, 28, 110-116.

BARR, B.C., ANDERSON, M.L., WOODS, L.W., DUBEY, J.P. y CONRAD, P.A. 1992. Neospora-like protozoal infections associated with abortion in goats. J. Vet. Diagn. Invest., 4, 365-367.

BARR, B.C., CONRAD, P.A., BREITMEYER, R., SVERLOW, K., ANDERSON, M.L., REYNOLDS, J., CHAUVET, A.E., DUBEY, J.P. y ARDANS, A.A. 1993. Congenital neospora infection in calves born from cows that had previosly aborted Neospora-infected fetuses: four cases (1990-1992). JAVMA, Vol. 202 (1), 113-117.

BARR, B.C., ROWE, J.D., SVERLOW, K.W., BONDURANT, R.H., ARDANS, A.A., OLIVER, M.N. y CONRAD, P.A.

1994. Experimental reproduction of bovine fetal Neospora infection and death with a bovine Neospora isolate. J. Vet. Diagn. Invest., 6, 207-215.

BJERKAS, I., MOHN, S.I. y PRESTHUS, J. 1984. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. Z. Parasitenkd., 70, 271-274.

BJERKAS, I. y PRESTUS, J. 1988. Immuno-histochemical and ultrastructural characteristics of a cyst-forming sporozoan associated with encephalomielitis and myositis in dogs. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand., 96, 445-454.

COLE, R.A., LINDSAY, D.S., DUBEY, J.P. y BLAGBURN, B.L. 1993. Deteccion of *Neospora caninum* in tissue sections using a murine monoclonal antibody. J. Vet. Diagn. Invest., 5, 579-584.

CONRAD, P.A., BARR, B.C., SVERLOW, K.W., ANDERSON, M., DAFT, B., KINDE, H., DUBEY, J.P., MUNSON, L. y ARDANS, A. 1993. In vitro isolation and characterization of a *Neospora sp.* from aborted bovine foetuses. Parasitology, 106, 239-349.

CUDDON, P., LIN, D., BOWAN, D.D., LINDSAY, D.S., MILLER, T.K., DUCAN, I.D., DELAHUNTA, A., CUMMINGS, J., SUTA, M., COOPER, B., KING, J.M., DUBEY, J.P. 1992. *Neospora caninum* infection in English springer spaniel littermates. J. Vet. In. Med., 6, 325-332.

DUBEY, J.P., CARPENTER, J.L. y SPEER, C.A. 1988. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. JAVMA, 192, 1269-1285.

DUBEY, J.P., HARTLEY, W.J., LINDSAY, D.S. y TOPPER, M.J. 1990. Fatal congenital *Neospora caninum* infection in a lamb. J. Parasitol., 76 (1), 127-130.

DUBEY, J.P. y PORTEFIELD, M.L. 1990. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. J. Parasitol. 76 (5), 732-734.

DUBEY, J.P. 1992. A review of *Neospora caninum* and Neospora-like infections in animals. J. Protoozol. Res. 2, 40-52.

DUBEY, J.P., ACLAND, H.M. y HAMIR, A.N. 1992. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in a stillborn goat. J. Parasitol. 78 (3), 532-534.

DUBEY, J.P. y LINDSAY, D.S. 1993. Neosporosis. Parasitology Today. Vol. 9 (12), 452-458.

DUBEY, J.P., METZGER, F.L., HATTEL, A.L., LINDSAY, D.S., y FRITZ, D.L. 1995. Canine cutaneous neosporosis: clinical improvement with clindamycin. Veterinary Dermatology 6 (1), 37-43.

GREIG, B., ROSSOW, K.D., COLLINS, J.E. y DUBEY, J.P. 1995. *Neospora caninum* pneumonia in an adult dog. JAVMA, 206, (7), 1000-1001.

HAY, W.H., SHELL, L.G., LINDSAY, D.S. y DUBEY, J.P. 1990. Diagnosis and treatment of *Neospora caninum* infection in a dog. JAVMA, 197, (1), 87-89.

HOLMDHAL, O.J.M., MATTSSON, J.G., UGGLA, A., JOHANSSON, K.E. 1994. The phylogeny of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* based on ribosomal RNA sequences. FEMS Microbiology Letters 119, 187-192.

LINDSAY, D.S. y DUBEY, J.P. 1989-a. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. Am. J. Vet. Res., 50, (11), 1981-1983.

LINDSAY, D.S. y DUBEY, J.P. 1989-b. *In vitro* development of *Neospora caninum* (Protoza: Apicomplexa) from dogs. J. Parasitol., 75 (1), 163-165.

LINDSAY, D.S., SPEER, C.A., TOIVIO-KINNUCAN, M.A., DUBEY, J.P. y BLAGBURN, B.L. 1993. Use of infected cultured cells to compare ultrstructural features of *Neospora caninum* from dogs and *Toxoplasma gondii*. Am. J. Vet. Res., 54, 1, 103-106.

LINDSAY, D.S., RIPPEY, N.S., COLE, R.A., PARSONS, L.C., DUBEY, J.P., TIDWELL, R.P. y BLAGBURN, B.L. 1994. Examination of the activities of 43 chemotherapeutic agents againts *Neospora caninum* tachyzoites in culture cells. Am. J. Vet. Res., 55, (7), 976-981.

MAYHEW, I.G., SMITH, K.C., DUBEY, J.P., GATWARD, L.K. y MCGLENNON, N.J. 1991. Treatment of encephalomyelitis due to *Neospora caninum* in a litter of puppies. J. Small An. Prac., 32, 609-612.

NIETFELD, J.C., DUBEY, J.P. y ANDERSON, M.L. 1992. Neospora-like protozoan infection as a cause of abortion in a dairy cattle. J. Vet. Diagn. Invest., 4, 223-236.

OTTER, A., JEFFREY, M., GRIFFITHS, I.B. y DUBEY, J.P. 1995. A survey of the incidence of *Neospora caninum* infection in aborted and stillborn bovine fetuses in England and Wales. Vet. Rec., 136, 602-606.

ODIN, M. y DUBEY, J.P. 1993. Sudden death associated with *Neospora caninum* myocarditis in a dog. JAVMA, 203, (6), 831-833.

SHEAHAN, B.J., CAFFREY, J.F., DUBEY, J.P. y MCHENRY, D.F. 1993. *Neospora caninum* encephalomyelitis in seven dogs. Irish Vet. J., 46, 3-7.

SPEER, C.A. y DUBEY, J.P. 1989. Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cyst of *Neospora caninum*. J. Protozool, 36, 458-463.

THORNTON, R.N., GAJADHAR, A. y EVANS, J. 1994. Neospora abortion epidemic in a dairy herd. New Zealand Vet. J., 42, 190-191.

TREES, A.J., GUY, F., TENNANT, B.J., BALFOUR, A.H. y DUBEY, J.P. 1993. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in a population of urban dogs in England. Vet. Rec., 132, 125-126.

TREES, A.J., GUY, F., LOW, J.C., ROBERTS, L., BUXTON, D. y DUBEY, J.P. 1994. Serological evidence implicating Neospora species as a cause of abortion in British cattle. Vet. Rec., 134, 405-407.

YAEGER, M.J., SHAWD-WESSELS, S. y LESLIE-STEEN, P. 1994. Neospora abortion storm in a midwestern dairy. J. Vet. Diagn. Invest., 6, 506-508.

(Aceptado para publicación en 21 de mayo de 1996)

XXI Jornadas Científicas de la Sociedad Española de

Ovinotecnia y Caprinotecnia

Logroño, 3, 4 y 5 de octubre de 1996

Día 3 jueves

8.30 h.	Recogida de documentación
9.30 h.	Inauguración
10.00 h.	Ponencia: Recursos pastables y alternativas de suplementación en ovino
11.30 h.	Ponencia: Producción lechera en la especie caprina
13-14 h.	Comunicaciones
16-17.30 h.	Comunicaciones
18-20 h.	Asamblea de socios
20.30 h.	Recepción Ayuntamiento de Logroño

Día 4 viernes

9.00 h.	Mesa Redonda: "Situación actual de los esquemas de mejora génética en la especie ovina"
11-14 h.	Comunicaciones
16 h.	Visita explotación ganadera
19.30 h.	Recepción Autonomía de La Rioja

Día 5 sábado

9.00 h.	Ponencia: Enfermedades emergentes en pequeños rumiantes
11-13 h.	Comunicaciones
13.30 h.	Clausura
14.00 h.	Comida de la SEOC

Para más información puede ponerse en contacto con la Secretaría de las Jornadas:

Fundación Caja Rioja
C/ Miguel Villanueva 9, 6.°
26001 Logroño (La Rioja)
Tlf: 941-293192
Fax: 941-293124

ITEA (1996), Vol. 92A N.º 2, 77-91

CARACTERÍSTICAS TÉCNICO-ECONÓMICAS DE LOS SISTEMAS PRODUCTIVOS DE CARNE VACUNA DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS

A. A. Rodríguez Castañón
L. A. Alfageme Beovide

Centro de Investigación Aplicada y Tecnología Agroalimentaria (CIATA)
33300 Villaviciosa (Asturias)

RESUMEN

En este trabajo se procede al análisis del subsector vacuno de carne asturiano a través del estudio técnico-económico de cuatro sistemas de producción diferentes: sistema Asturiana de la Montaña, sistema puertos, sistema semiestabulación regular y sistema mínima estabulación. En el mismo se pone de manifiesto que tanto las características técnicas como económicas son diferentes y, que la mayor rentabilidad se consigue en aquellos sistemas que disponen de menores costes y menores ingresos. Los resultados obtenidos sugieren una mayor rentabilidad de los sistemas extensivos (Asturiana de la Montaña y mínima estabulación), debido fundamentalmente al mayor uso de pastoreo y a la consiguiente reducción en costes de alimentación.

Palabras clave: Costes, Rentabilidad, Manejo, Alimentación.

SUMMARY
TECHNICAL AND ECONOMICAL CARACTERISTICS OF BEEF CATTLE PRODUCTION SYSTEMS OF ASTURIAS (SPAIN)

In this paper we proceed to analyze the asturian beef cattle sector throught the technical and economical study of four different production systems. We report that the four production systems are differents, and the main profitability obtained with that system in which we have the lower costs and incomes, therefore resulting more interesting the extensive systems (system with Asturian of Mountain and system with minimun confined), due to the use of a greater percentage of grazing time.

Key words: Costs, Profitability, Management, Feeding.

Introducción

El sector ganadero asturiano, que aporta más del 70% de la Producción Final Agraria de la región (SADEI, 1993), atraviesa por una situación fráncamente difícil, ya que a los tradicionales problemas estructurales que de siempre han existido en el sector, hay que añadir los efectos negativos que actualmente están provocando los productos lácteos y cárnicos comunitarios que entran en España a precios más competitivos. Ante esta situación, resulta evidente que si se quiere seguir siendo competitivo en el mercado es nece-

sario mejorar la eficiencia productiva de las explotaciones con objeto de reducir el coste medio de producción, en especial en la mayoría de explotaciones de media y alta montaña asturiana, en donde las difíciles condiciones orográficas y climáticas hacen que éste resulte muy elevado.

A pesar de esto, las perspectivas de futuro para el subsector de la carne de vacuno asturiana no son totalmente negativas, dado que las actuales directrices comunitarias en esta materia (Reforma de la PAC) van encaminadas a potenciar la extensificación de la producción, primando sistemas como los de Asturias basados en vacas de cría mantenidas en superficies forrajeras. Además, los recientes escándalos por engorde fraudulento con sustancias prohibidas han provocado un retraimiento en la demanda y una mayor concienciación por parte del consumidor, que fortalece a la carne asturiana obtenida con los sistemas que mejor utilizan los recursos forrajeros propios, al mostrar el consumidor cada vez más interés en carnes producidas de manera natural.

Por todo lo comentado, se hace necesario un análisis del sector vacuno de carne asturiano, que ponga de manifiesto las deficiencias económicas de los diferentes sistemas productivos y cuyos resultados puedan contribuir a solventarlas, así como a la necesaria reordenación del subsector cárnico, tanto en el aspecto productivo como en el comercial. Con ello, se podrían conseguir explotaciones de vacuno eficientes, que a su vez permitirían alcanzar dos objetivos:

1. Mantener puestos de trabajo en el campo asturiano, evitando con ello el continuo despoblamiento y emigración a las zonas industriales asturianas, también inmersas en una profunda crisis y,

2. Realizar una labor ecológica muy importante, ya que se conservarían y mejorarían pastos que de otra manera estarían abocados al total abandono y consiguiente avance de la matorralización.

A pesar de la importancia que el subsector vacuno de carne tiene para la economía regional, los estudios realizados sobre el mismo son prácticamente inexistentes. Se limitan a estudios de mercado (INVESMARK, 1988; ARTHUR ANDERSEN, 1991), o de costes de producción como los de CAMPOS PALACIN (1985) y MARQUINEZ (1986) con 6 explotaciones cada uno en el Concejo de Somiedo y, el de RODRÍGUEZ (1989) con 12 explotaciones de la montaña central asturiana.

En este estudio, se muestran los resultados técnico-económicos de 29 explotaciones del Principado de Asturias, sometidos a un análisis multivariante para determinar la relación entre variables y la influencia de los componentes de los costes e ingresos.

Material y métodos

El trabajo de campo se inició en el año 1991 y consistió en ir localizando y definiendo los diferentes sistemas productivos. Mediante reuniones con técnicos de asociaciones ganaderas (ASEAVA, ASEAMO), de comercializadoras de carne (ASCAR) y de la Consejería de Agricultura del Principado de Asturias se fueron predefiniendo sistemas y preseleccionando las posibles explotaciones a seguir. Se procuró que las mismas pertenecieran a los Núcleos de Control de rendimiento cárnico ya existentes con objeto de contrastar los resultados técnicos obtenidos.

Una vez preseleccionadas las ganaderías, se fueron visitando una a una al objeto de solicitar su colaboración, obtener caracterís-

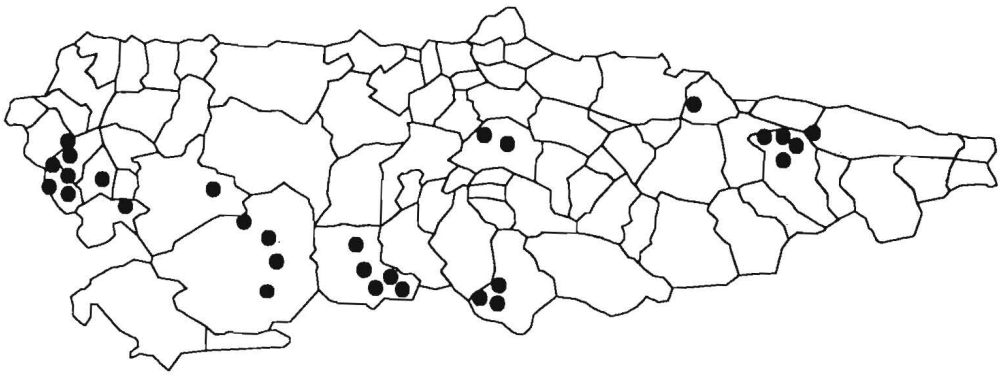
ticas de los sistemas y diseñar las futuras encuestas a emplear. Al tratarse de un trabajo en el cual se les demandaba información económica, muchos de los ganaderos visitados fueron reacios a participar en el mismo. Otros, después de varios meses de colaboración, renunciaron a seguir. Así fue como, aunque las visitas comenzaran en el año 1991, no fue hasta 1993 cuando se dispuso de 29 explotaciones fiables y dispuestas a colaborar en el estudio (8 explotaciones de cada uno de los tres sistemas de Asturiana de los Valles y 5 explotaciones de Asturiana de la Montaña), apareciendo su localización en el mapa 1.

Estas 29 explotaciones fueron visitadas mensualmente y en cada visita se cumplimentaban cuestionarios de dos tipos:

– En el primero se anotaban los gastos e ingresos del mes.

– El segundo, que constaba de cinco hojas y se realizó al final del estudio, tenía como finalidad el recoger información no reflejada anteriormente, así como repasar algunas partidas por si se habían cometido errores. Así, la hoja 1 recogía los gastos de sanidad de todo el año, la hoja 2 reflejaba la maquinaria existente en la explotación, la hoja 3 las instalaciones, la hoja 4 informaba de los forrajes conservados (heno y ensilado) realizados en la explotación y la hoja 5 recogía los gastos financieros, subvenciones y primas a la producción.

La estimación de costes en explotaciones vacunas asturianas no es sencilla, ya que además de lo difícil que resultan de estimar algunos factores (coste del ganado, coste de la mano de obra familiar, etc), se debe de tener en cuenta que las explotaciones con vacas de cría asturianas son por lo general de carácter mixto en donde, además de esas vacas coexisten una agricultura de autoconsumo y otros tipos de animales (vacas de leche, ovejas, etc), resultando con ello una producción conjunta no acoplada que dificulta el estudio al existir una serie de costes repartibles (ALONSO y SERRANO, 1991). Por este motivo, se supuso que el coste total de la explotación consta de las partidas de alimentación, instalaciones, sanidad y otros costes, cada una de las cuales engloba a su vez a los componentes que aparecen en el cuadro 1.



Mapa 1. Localización geográfica de las explotaciones consideradas.
Geographic localization of farms

CUADRO 1
COMPONENTES DEL COSTE DE PRODUCCION
COMPONENTS OF PRODUCTION COST

Alimentación		Instalaciones	Sanidad	Otros costes
Maquinaria	Pastos			
Seguros	Contribución rústica	Seguros	Cesáreas y partos	Seguridad social
Alquileres	Arrendamientos	Gastos generales	Inseminaciones y lavados	Seguro animales
Reparaciones	Materiales	Amortizaciones	Mamitis y secados	Cuotas asociaciones
Amortizaciones	Jornales	Intereses	Desparasitaciones	Compra animales
Combustible	Semillas	Mantenimiento	Resto sanidad vacas	Amortización reproductores
Lubricantes	Fitosanitarios		Diarreas terneros	Intereses
Intereses	Fertilizantes		Resto sanidad terneros	Transportes

Los ingresos de la actividad del vacuno de carne tenían dos procedencias:

– Venta de ganado para vida o sacrificio.

– Primas y subvenciones: prima a la vaca nodriza, prima al ternero macho, indemnización compensatoria de montaña y, en el caso del sistema de Asturiana de la Montaña, prima a la conservación de la raza.

Finalmente, se consideró la capitalización ganadera como el incremento del rebaño o diferencia de inventario que durante ese año tuvo lugar, imputando el precio de mercado a cada tipo de animal incrementado.

Conocidos los ingresos y capitalización ganadera, así como los costes de la actividad, se procedió al cálculo del beneficio, entendido como la diferencia entre ambas partidas.

Una vez conocidos los beneficios de la actividad, se estimó el umbral de rentabilidad como aquel tamaño de explotación que permite generar una determinada renta (CAVERO y HERNÁNDEZ, 1987), estimándose en este caso como el número de vacas necesario para alcanzar la Renta de Referencia reflejada en el R.D. 1.887 sobre Mejora de las Estructuras Agrarias.

Con objeto de caracterizar parámetros de los diferentes sistemas productivos, se hizo necesaria la definición de una unidad de referencia que permitiera además comparar sistemas. Los sistemas de producción estudiados ofertan productos muy diferentes (terneros al destete, terneros para sacrificio, vacas para vida, novillas, etc). Es imposible referir los resultados a unidades típicas, como kg vivo (ya que no se conocen los pesos de todos los animales vendidos) o kg canal (ya que no va a sacrificio todo lo vendido). Por tanto, se tomó como referencia la unidad de ganado mayor (UGM), definida tras reuniones con técnicos de las asociaciones de ganaderos y de la Consejería de Agricultura de la siguiente manera:

1 vaca (animal que ya ha parido alguna vez)	= 1 UGM
1 novilla (desde 1 año hasta el parto)	= 0,7 UGM
1 ternera de reposición (desde destete hasta 1 año)	= 0,5 UGM
1 ternero en cebo (desde destete hasta sacrificio)	= 0,7 UGM
1 ternero lactante (desde nacimiento hasta destete)	= 0,3 UGM
1 semental (animal para monta natural)	= 1 UGM

Los resultados económicos obtenidos en los diferentes sistemas productivos fueron sometidos a un análisis de varianza a través del paquete estadístico SAS (SAS Inc, 1987). Se utilizó el test de comparación de medias Student-Newman-Keuls, que permite la comparación simultánea de los niveles en los factores y que tiene la máxima sensibilidad dentro de los test de rango múltiple (MILLER, 1981). Además, se realizó un análisis factorial de componentes principales (ACP), con el fin de caracterizar los sistemas productivos y describir multifactorialmente la estructura de los costes e ingresos, empleando para ello el paquete estadístico STATIS (INRA, 1987).

Resultados y discusión

Caracterización de los diferentes sistemas productivos

La clasificación de las explotaciones incluidas en este estudio según sistemas de producción diferentes, no puede hacerse atendiendo a una única variable o relación entre variables, puesto que además de la homogeneidad entre ellas, cada explotación presenta peculiaridades respecto al resto. Por ello, se impone realizar un análisis multivariante sobre los datos técnicos recogidos en las explotaciones (JUDEZ, 1989), de modo que sea la combinación de los componentes principales con las relaciones entre variables de cada explotación la que nos caracterice su estructura productiva.

De este modo, los aspectos técnicos que se estudiaron para analizar su posible influencia sobre la rentabilidad de los sistemas fueron la raza, el manejo de vacas reproductoras, el de terneros lactantes, la intensificación productiva, la alimentación de vacas reproductoras, la producción forrajera y la eficiencia de la mano de obra propia. Se muestra en el cuadro 2 la descripción de las variables consideradas para caracterizar dichos aspectos, así como las unidades en que se han medido.

El análisis en componentes principales (ACP) realizado explica en sus dos primeros ejes extraídos un 60% de la variación total encontrada. Dada la dispersión de datos existente, se considera suficiente como para obtener conclusiones.

La figura 1 muestra la representación de las variables técnicas en el primer plano factorial. De la observación del primer plano, del coeficiente de correlación de las variables técnicas con los componentes principales, y utilizando como criterio para la definición de los ejes factoriales un coeficiente de correlación eje-variable superior al 70%, se desprenden los siguientes resultados:

CUADRO 2
VARIABLES CONSIDERADAS
TECHNICAL AND ECONOMICAL VARIABLES

	GRUPO	CODIG	VARIABLE	UNIDAD
	RAZA	a1	Raza	0 / 1
VARIABLES TECNICAS	MANEJO DE VACAS REPRODUCTORAS	B	Estancia en establo	Días/año
		C	Estancia en puertos	Días/año
		D	Estancia en monte pastable	Días/año
		E	Pastoreo solo	Días/año
		F	Pastoreo suplementado	Días/año
	MANEJO DE TERNEROS	G	Terneros lactantes que pastan	%
		H	Terneros vendidos al destete	%
	INTENSIFICACION PRODUCTIVA	I	Carga ganadera	UGM/ha
		J	Aprovechamiento de forraje	kg MS/ha
	ALIMENTOS POR VACA	K	Heno consumido	kg MS/año
		L	Ensilado consumido	kg MS/año
		M	Hierba verde segada consumida	kg MS/año
		N	Pienso consumido	kg MS/año
	PRODUCCION DE FORRAJES PROPIOS	O	Heno producido	%
		P	Ensilado producido	%
		Q	Hierba verde segada producida	%
		R	Hierba verde pastada	%
	MANO DE OBRA PROPIA EMPLEADA	S	Elaboración de hierba pastada	Horas/t
		T	Elaboración de heno	Horas/t
		U	Elaboración de ensilado	Horas/t
		V	Elaboración de hierba verde	Horas/t
VARIABLES ECONOMICA	COSTES DE	W	Coste total	pta/UGM
		X	Sanidad	%
		Y	Instalaciones	%
		Z	Alimentos propios	%
		AA	Alimentos comprados	%
		AB	Seguridad Social Agraria	%
		AC	Otros costes	%
	INGRESOS	AD	Ingreso total	pta/UGM
		AE	Venta para vida	%
		AF	Venta para carne	%
		AG	Primas y subvenciones	%
	CAPITALIZACION	AH	Incremento del rebaño	pta/UGM
	BENEFICIO SIN PRIMAS	AI	Beneficio por UGM producida	pta
		AJ	Beneficio por explotación	pta
		AK	Beneficio por vaca	pta
	BENEFICIO CON PRIMAS	AL	Beneficio por UGM producida	pta
		AM	Beneficio por explotación	pta
		AN	Beneficio por vaca	pta
	COSTE DE PRODUCCION DE FORRAJES PROPIOS	AO	Coste del pasto	pta/kg MS
		AP	Coste del heno	pta/kg MS
		AQ	Coste del ensilado	pta/kg MS
		AR	Coste de hierba verde segada	pta/kg MS
	UMBRAL DE RENTABILIDAD	AS	Vacas necesarias/explotación	Nº vacas
		AT	UGM a producir/explotación	Nº UGM

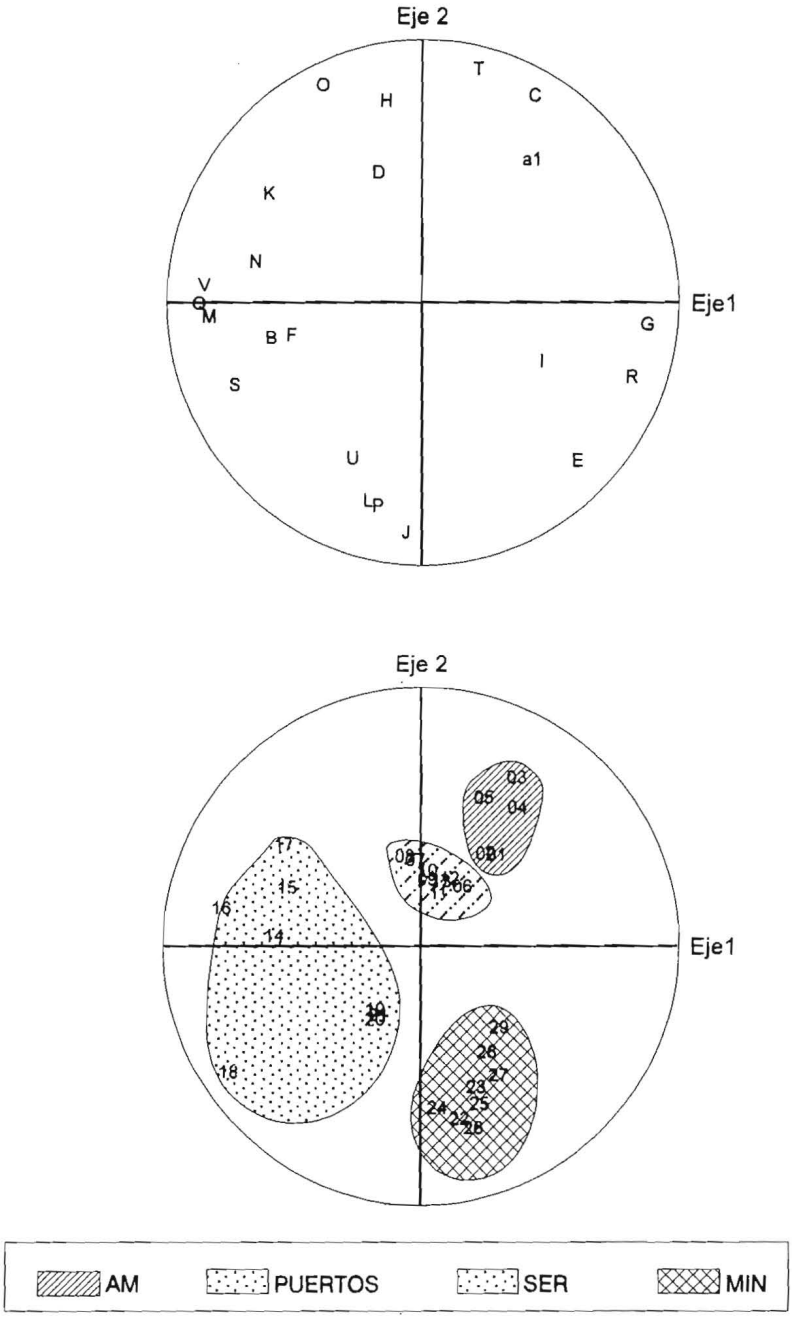


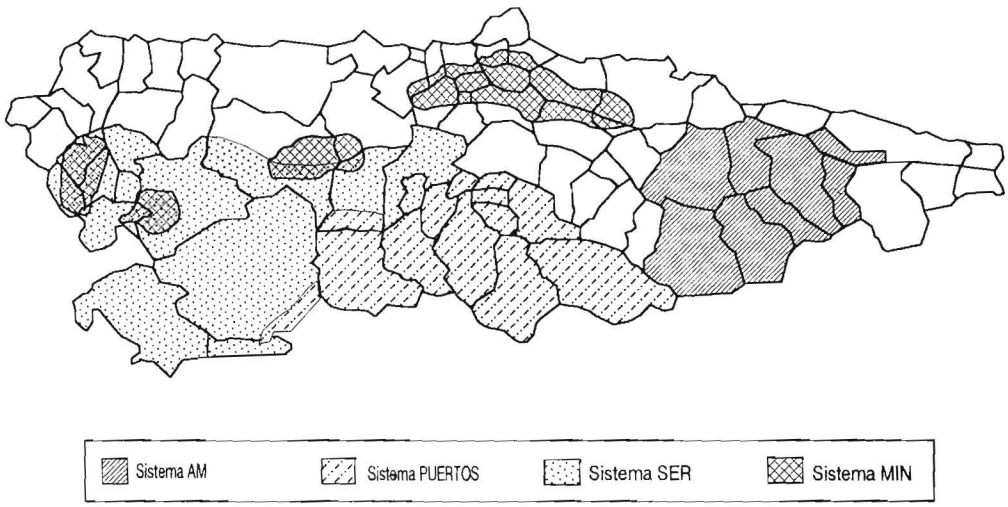
Figura 1. Representación de las variables técnicas (parte superior) y de las explotaciones (parte inferior) en el primer plano factorial

Figure 1. Technical variables (above) and farms (below) in the first factorial plane

1 El primero de los factores extraídos está correlacionado positivamente con el pastoreo del terneros lactantes (G) y el aprovechamiento en forma de hierba pastada (R). Negativamente, con aquellas variables relacionadas con el aprovechamiento de hierba segada a pesebre (Q, V, M) y la eficiencia de la mano de obra para producción de hierba para su pastoreo (S). Por tanto, este eje caracteriza las explotaciones según la forma de aprovechamiento del forraje en verde, bien sea en pastoreo (hacia la derecha del eje) o suministrada en pesebre (hacia la izquierda del mismo).

2. El segundo de los ejes retenidos, se correlaciona positivamente con el aprovechamiento en forma de heno (O), la ineficiencia de la mano de obra en la elaboración del mismo (T) y el % de terneros vendidos al destete (H). Negativamente, con la productividad forrajera (J) y la utilización del ensilado como método de conservación del forraje (L, P). Este factor caracteriza, por tanto, la forma de conservación del forraje empleada (heno hacia arriba, y ensilado hacia abajo del eje), así como la forma de venta de los terneros (venta al destete hacia arriba).

Una vez extraídos los factores, se caracterizaron sobre ellos las explotaciones (figura 1, parte inferior), comprobando como los datos técnicos utilizados y sus componentes retenidos por el ACP determinan la existencia de cuatro sistemas de producción diferentes. El primero corresponde al sistema de la Asturiana de la Montaña (sistema AM), el segundo al sistema de Asturiana de los Valles con subida a puertos de montaña (sistema PUERTOS), el tercero al sistema de Asturiana de los Valles con semiestabulación regular (sistema SER), y el cuarto al sistema de Asturiana de los Valles con estabulación mínima (sistema MIN). Estos sistemas coinciden plenamente con los descritos por las asociaciones de ganaderos (ALONSO, 1992; GOYACHE, 1995), y tienen una ubicación bien definida dentro de la geografía asturiana (mapa 2).



Mapa 2. Ubicación de los sistemas productivos del Principado de Asturias
Geographic localization of production systems from Asturias

El sistema AM resulta estar caracterizado por una baja productividad forrajera, la utilización del henificado como método de conservación del forraje, la venta de las crías al destete y el aprovechamiento en pastoreo de la superficie forrajera propia.

El sistema PUERTOS coincide en esencia con el anterior, estando en parte discriminado por la introducción de la variable raza explotada (Asturiana de los Valles). Se diferencia además del sistema AM en que se realiza un menor aprovechamiento del pasto, como consecuencia de los largos períodos invernales en que se estabula al ganado y, en una venta más tardía de los terneros.

En el sistema SER, el análisis realizado discrimina los dos subsistemas existentes (Cangas del Narcea y Allande) en función del momento de venta de los terneros (al destete en Cangas del Narcea y una vez cebados en Allande). Presenta una mayor dispersión y, se caracteriza fundamentalmente por la siega de forraje verde y su suministro en pesebre.

El sistema MIN se distingue por unas elevadas productividades forrajeras, por la utilización del ensilado como forma de conservación del forraje, por el cebo de los terneros y por mayor número de días de pastoreo de la superficie forrajera propia.

Resultados económicos de los sistemas de producción

Los resultados económicos obtenidos en los diferentes sistemas productivos se muestran en el cuadro 3, pudiendo observar como corresponden los menores costes (86.600 pta/UGM producida) al sistema más extensivo (AM), y como se incrementan a medida que se intensifica la producción (MIN, SER y PUERTOS).

La partida de sanidad supone entre el 6 y el 9% de los costes totales, sin diferencias entre sistemas. Pero, referido a las UGM producidas, supone unas oscilaciones considerables, comprendidas entre las 5.200 pta del sistema AM y las 14.200 pta del sistema SER (muchos gastos en cesáreas al disponer de vacas culonas). Las instalaciones presentan diferencias entre el sistema MIN (10,5% de los costes) y los otros tres sistemas (entre 4,3 y 6,6%), por ser las explotaciones MIN las únicas que se están acogiendo a planes de mejora y disponen, por tanto, de amortizaciones que elevan esta partida. La alimentación del ganado representa entre el 38% de los costes en el sistema PUERTOS y el 62% en el sistema SER, correspondiendo por lo general los mayores porcentajes a aquellos sistemas que compran más alimentos fuera de la explotación. La partida de otros costes ofrece grandes diferencias entre sistemas, en especial en lo que se refiere al sistema PUERTOS. Alcanza las 101.000 pta/UGM producida (44% de los costes totales de producción), mientras en los otros tres oscila entre 30.000 y 40.000. Se debe básicamente a la amortización del ganado reproductor, que en estas zonas tiene un elevado valor.

En cuanto a los ingresos, el sistema PUERTOS presenta los mayores ingresos (446.800 pta/UGM producida), significativamente diferentes a los de los otros tres, que oscilaron entre las 221.800 pta del MIN y las 305.500 pta del SER. Se debe a que en este sistema se venden fundamentalmente animales para vida (el 63% de los ingresos), a elevados precios (como media cada UGM se vendió a 328.900 pta). Las primas y subvenciones representan alrededor del 15-17% de los ingresos, a no ser en el sistema AM, en donde la existencia de una prima

CUADRO 3
RESULTADOS ECONOMICOS DE LOS SISTEMAS PRODUCTIVOS
ECONOMIC RESULTS OF PRODUCTION SYSTEMS

	SISTEMA AM	SISTEMA PUERTOS	SISTEMA SER	SISTEMA MIN
COSTES DE PRODUCCION				
(Miles pta/UGM producida)	86.6 ± 13,8 a	230,6 ± 88.1 c	206,2 ± 49,5 b	127,1 ± 25,3 ab
- Sanidad (%)	6,5 ns	7.2 ns	9,2 ns	6,7 ns
- Instalaciones (%)	4,3 a	6.4 a	6,6 a	10.5 b
- Alimentación (%)	38,3 a	42,6 a	62,3 b	58,9 b
- Otros costes (%)	50,9 a	43,8 b	21,8 c	23,9 c
INGRESOS				
(Miles pta/UGM producida)	225,5 ± 55,3 a	446,8 ± 152,4 b	305,5 ± 115,6 a	221.8 ± 39,2 a
- Venta para vida (%)	54,1 a	63,5 a	27,3 b	33,8 b
- Venta para carne (%)	2,3 a	20,3 a	55,3 b	51,2 b
- Subvenciones (%)	43,6 a	16,2 b	17,3 b	15,0 b
CAPITALIZACION GANADERA				
(Miles pta/UGM producida)	77, ± 61,2 ns	10,2 ± 24,5 ns	43,3 ± 73,3 ns	67,5 ± 59,4 ns
BENEFICIO CON SUBVENCIONES				
- Miles pta/explotación	1.683 ± 511 ab	1.154 ± 350 b	1.047 ± 519 b	2.347 ± 1.090 a
- Miles pta/UGM prod	220,0 ± 14,4 a	224,5 ± 55,1 a	157,2 ± 46,3 b	162,2 ± 27,5 b
- Miles pta/vaca mantenida	121.0 ± 23,8 a	91,0 ± 11,1 b	84,6 ± 8.9 b	99,2 ± 20,1 b
UMBRAL RENTABILIDAD				
(vacas/explotación)				
- Con subvenciones	15,3 ± 2.7 a	20,0 ± 2,5 b	21,5 ± 2,3 b	19,0 ± 4,7 b
- Sin subvenciones	28,0 ± 6.9 ab	30,0 ± 5,0 ab	32,8 ± 3.9 a	24,5 ± 6.9 b

a, b, c: distintas letras en la misma fila equivalen a medias significativamente diferentes a $p < 0,05$
ns: diferencias no significativas

adicional (conservación de la raza Asturiana de la Montaña) origina que esta partida suponga casi el 44% de los ingresos.

Con todo esto, el beneficio obtenido tanto con primas como sin ellas, aumenta con el tamaño de la explotación, desde los sistemas en que es menor (SER y PUERTOS) hasta los de mayor tamaño (AM y MIN). En cuanto al beneficio por UGM producida, es superior en PUERTOS y AM, consecuencia directa de los elevados precios de venta y primas percibidas, así como de la menor productividad de los mismos. Si el beneficio se refiere a vacas mantenidas en la explotación, el sistema AM sigue siendo el más interesante, mientras que para los relativos a la raza Asturiana de los Valles, el MIN es el de mejor rendimiento por vaca.

Teniendo en cuenta que las primas no perdurarán de por vida, los umbrales de rentabilidad se estimaron si tener en cuenta las mismas. Considerando los precios y demás características manejadas en este trabajo, resultaron unos umbrales comprendidos

entre las 24,5 vacas del sistema MIN y las 32,8 del sistema SER (RODRÍGUEZ CASTAÑÓN, 1996). El menor valor del MIN se debe al cebo de los terneros y al mejor aprovechamiento de los prados, mediante una mayor carga ganadera y más porcentaje de pastoreo.

Relación entre los datos técnicos y económicos obtenidos

Al objeto de relacionar los resultados económicos de cada sistema con aquellas técnicas que los caracterizan, se añadieron al ACP anterior las variables económicas siguientes: costes totales, ingresos totales, beneficio sin primas, beneficio con primas y umbral de rentabilidad.

Al igual que en el caso anterior de caracterización de sistemas, hay que suponer que los datos económicos no son función de un solo parámetro, sino de la combinación e interrelación de todos ellos. Por tanto, el análisis a realizar debe de ser multifactorial, en lugar de limitarse a la clásica división en cabeza-media-cola según conceptos individuales.

Los ejes retenidos en el ACP son asimilables a los que originaban las razones técnicas, y sobre ellas la clasificación de los sistemas es similar a la anteriormente descrita, si bien en este caso, por la dispersión propia de los resultados económicos, la fracción de inercia que explican los ejes retenidos desciende al 53% del total.

Los coeficientes de correlación de las variables económicas con los ejes factoriales nos indican una correlación positiva entre los costes totales/UGM (W) y el eje 1, que define a los sistemas por la diferente utilización del forraje en verde (figura 2). Esto hace suponer que las explotaciones que utilizan el aprovechamiento en pastoreo frente al acarreo del forraje a pesebre obtienen unos costes menores. En este punto, como se observa en la mencionada figura 2 (parte inferior) los sistemas referenciados que obtienen menores costes son el AM y el MIN, influenciados por el manejo del forraje en pastoreo. Por contra, los de mayores costes fueron el PUERTOS y el SER, caracterizados por el eje 2 (asociado a tipo de conservación del forraje, venta del ternero y productividad forrajera).

La razón económica ingreso/UGM (AD) se encuentra íntimamente ligado a la variable costes, de manera que unos costes altos suponen mayores ingresos. Asímismo, este ratio se correlaciona positivamente con el eje 1, que asocia sistemas que emplean menos pastoreo. Además, la variable venta de terneros al destete está ligada positivamente con los ingresos, como consecuencia de que en los sistemas que se distinguen según ella (PUERTOS y SER), el precio de venta es superior por tratarse de animales que se venden para vida (PUERTOS) o presentar carácter culón (SER).

El sistema AM, aún estando asociado a la parte negativa del eje 2 (productividad forrajera baja, henificado en exclusiva y venta del ternero al destete), obtiene bajos ingresos/UGM debido a los menores precios de venta de los animales.

El sistema MIN obtiene menores ingresos/UGM que en PUERTOS y SER debido al menor precio de venta del producto (ternero cebado), e inferiores al AM por disponer de menores subvenciones.

El beneficio sin primas (AK) y el beneficio con primas (AN) se sitúan sobre el segmento negativo del eje 1. Según esto, los altos beneficios se consiguen en sistemas que utilizan mayormente el pastoreo, que está asociado a menores costes. Es impor-

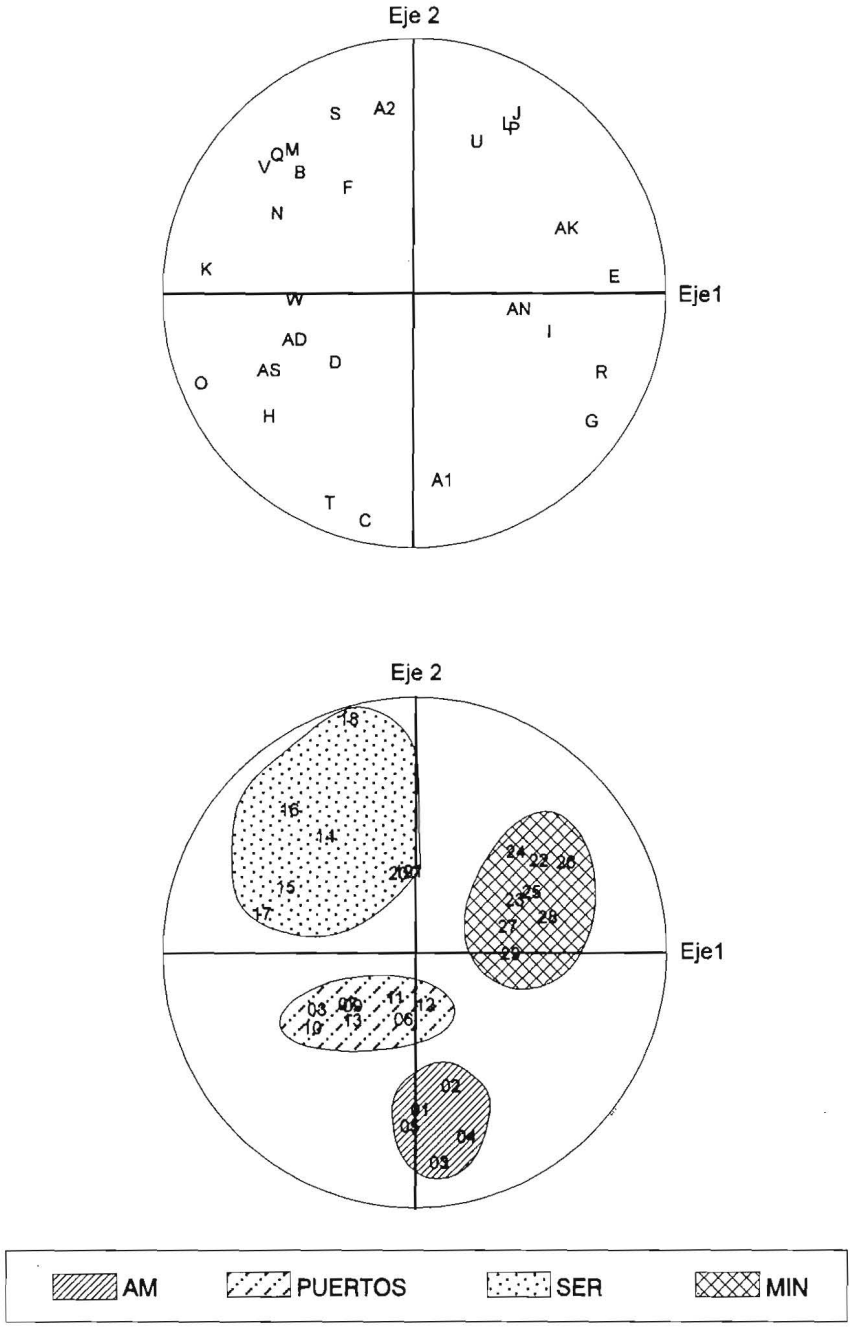


Figura 2. Representación de las variables económicas (parte superior) y de las explotaciones (parte inferior) en el primer plano factorial

Figure 2. Economical variables (above) and farms (below) in the first factorial plane

tante comentar que la alta rentabilidad se consigue gracias a los bajos costes, no a los altos ingresos, poniendo de manifiesto la importancia que la ganadería extensiva tiene en el futuro, no solamente desde el punto de vista económico, sino también desde el medioambiental. Por este motivo, los sistemas AM y MIN resultaron ser los que mayores beneficios obtuvieron.

Si tomamos como referencia los beneficios sin primas (AK), el sistema MIN resulta ser el más rentable gracias a los bajos costes (pastoreo) y a la alta productividad forrajera (eje 2). El AM pasa a ser el más interesante cuando se tienen en cuenta las primas, por ser el que mayores subvenciones percibe (32% de los ingresos).

El sistema PUERTOS se nos revela como el menos rentable, por estar asociado a costes muy altos (eje 1), superando el SER al anterior en función de una mayor productividad, tanto forrajera (eje 2) como ganadera (menor % de venta al destete).

Estructura de los costes e ingresos

Como hemos visto anteriormente, los mayores beneficios se consiguen en aquellos sistemas que obtienen menores ingresos y menores costes por UGM producida. Se pretende establecer en este apartado qué partidas constituyentes de los gastos e ingresos determinaron la mayor o menor rentabilidad de las explotaciones.

El análisis multifactorial ACP que incluya los datos referentes a la estructura de costes e ingresos (figura 3), nos permite deducir que el coste total (W) está caracterizado por el eje 1 (utilización del forraje en

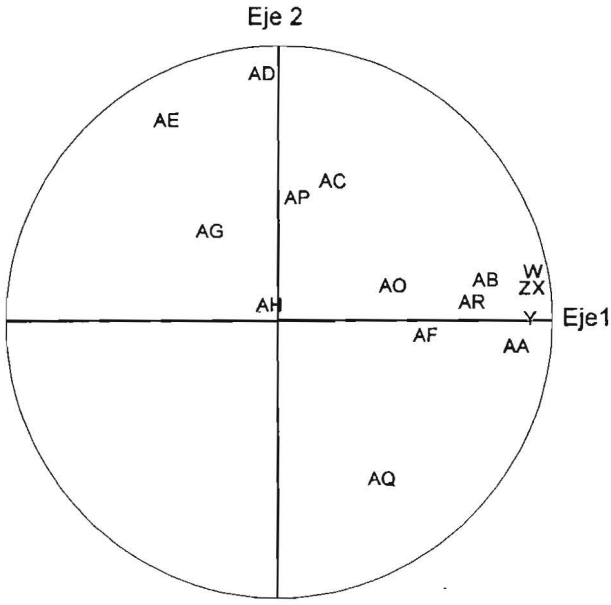


Figura 3. Representación de las variables determinantes de los costes e ingresos
Figure 3. Determinant variables of costs and incomes

verde), estando además asociado por igual a todos los componentes del mismo: sanidad (X), instalaciones (Y), alimentos propios (Z), alimentos comprados (AA) y seguridad social (AB). Se exceptúa la partida de otros costes (AC), que por tratarse fundamentalmente de compra y amortización de animales, está positivamente correlacionada con los ingresos.

Los ingresos totales (AD) están caracterizados por el eje 2 (conservación de forraje y venta de terneros) y positivamente correlacionados con las partidas de venta para vida (AE) y otros costes (AC). Se debe, respectivamente, al mayor precio de venta de los animales al destete y a la capitalización ganadera. Además, los ingresos están correlacionados positivamente con el coste de producción del heno (AP) y negativamente con el del ensilado (AQ), lo que indica que los mayores ingresos se consiguen en aquellos sistemas que disponen de mayores costes y mayores porcentajes de heno elaborado (PUERTOS).

Conclusiones

– Las explotaciones asturianas de carne de vacuno pueden agruparse en cuatro sistemas diferentes de producción (Asturiana de la Montaña, puertos, semiestabulación regular y estabulación mínima), los cuales presentan grandes diferencias en lo que se refiere a parámetros técnicos y resultados económicos.

– Dichos sistemas productivos quedan caracterizados por dos ejes. El primero caracteriza explotaciones según la forma de aprovechar el forraje en verde (pastoreo o pesebre), mientras que el segundo lo hace según la forma de vender los terneros y de conservar el forraje (heno o ensilado).

– Los sistemas de mayor rentabilidad fueron aquellos que se asociaron a menores costes, aún a costa de obtener menores ingresos. Además, los costes de producción se reducen en aquellos sistemas más extensivos que emplean el pastoreo frente a la alimentación en pesebre.

– Los sistemas de Asturiana de la Montaña (sistema AM) y el de Asturiana de los Valles con mínima estabulación (sistema MIN) resultaron ser los de mayores beneficios por vaca mantenida de todos los sistemas considerados en este trabajo. Por tanto, y de acuerdo con el nuevo enfoque que se le pretende dar a la nueva PAC, éstos deben ser los sistemas a tener en cuenta como modelos de producción rentable y compatible con el medio ambiente.

– El cebo de terneros en explotaciones con vacas de cría incrementa la rentabilidad de las mismas, debiendo ser, por tanto, una práctica habitual entre los ganaderos, máxime cuando en la actualidad están surgiendo Lábeles que garantizan la calidad del producto.

Bibliografía

ALONSO L. .1992. Raza Asturiana de los Valles. Eurocarne. 6. 69-73.

ALONSO R., SERRANO A., 1991. Los costes en los procesos de producción agraria. Ed. Mundi-Prensa, 147 pp.

ARTHUR ANDERSEN. 1991. Estudio económico de la comercializadora de carnes ASCAR. Trabajo no publicado. 45 pp.

CAMPOS PALACÍN P., 1985. Economía de las explotaciones ganaderas en Asturias. Revista de Estudios Agro-Sociales, 132, 43-74.

CAVERO F. J., HERNÁNDEZ J., 1987. Evaluación y viabilidad económica del riego por aspersión en un secano árido de Aragón. Comunicaciones INIA, Serie Economía, 24.

GOYACHE F., 1995. Influencia de efectos sistemáticos sobre los caracteres de importancia económica en la raza Asturiana de los Valles. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, 251 pp.

INRA, 1987. Programa STATIS, elaborado por C. Lavit en la Unidad de Biometría (ENSA-INRA-USTL) de Montpellier.

INVESMARK, 1988. Comercialización de la carne de vacuno en Asturias. Trabajo no publicado, 84 pp.

JUDEZ., 1989. Técnicas de análisis de datos multidimensionales. Bases teóricas y aplicaciones en agricultura. MAPA, Secretaría General Técnica. 301 pp.

MILLER R.G., 1981. Simultaneous Statistical Inference, New York: Springer-Velag.

MARQUINEZJ., 1986. Estudio ambiental del Concejo de Somiedo. Universidad de Oviedo, 708 pp.

RODRÍGUEZ F., 1989. La rentabilidad de las explotaciones ganaderas semiextensivas en la montaña central asturiana. ERIA Revista de Geografía, 18, 27-34.

RODRÍGUEZ CASTAÑÓN A., 1996. Umbrales de rentabilidad en explotaciones con vacas de cría de la Cornisa Cantábrica. Invest. agr.:Econ., 11 (1).

SADEI, 1993. Producto neto de la agricultura asturiana. Servicio de Publicaciones del Principado de Asturias, Oviedo, 59 pp.

SAS INSTITUTE INC., 1987. SAS User's Guide: Statistics, Version 5 Edition. Cary, NC. 956 pp.

(Aceptado para publicación el 21 de mayo de 1996)

Fira de Lleida

Convocatoria de la XXV edición del Premio del Libro Agrario

BASES

- El Premio otorgado será de 500.000 pesetas para el autor y placa conmemorativa para la editorial y el autor.
- El Jurado podrá declarar el Premio desierto o distribuir su importe en partes iguales entre dos o más obras.
- El veredicto del Jurado se efectuará en el mes de septiembre de 1996 y la entrega del Premio se realizará durante la celebración de la 42.ª edición de la FERIA DE SANT MIQUEL del 27 de septiembre al 1 de octubre. En este acto, el autor que haya obtenido el primer premio, expondrá el contenido de los aspectos fundamentales de la obra ganadora.

Para más información, dirigirse a FIRA DE LLEIDA

Camps Elisis - Ap. de Correus 106 - 25080 LLEIDA
Tels. (973) 20 20 00 - 20 14 15 - Fax. (973) 20 21 12

ITEA (1996), Vol. 92A N.º 2, 93-114

IDENTIFICACIÓN DEL SEXO A PARTIR DE MUESTRAS BIOLÓGICAS DE DIFERENTE ORIGEN MEDIANTE AMPLIFICACIÓN SELECTIVA DE ADN Y POSTERIOR ANÁLISIS DE RFLPs[1]

M. Villalta Martín[2]
J.L. Alabart Álvarez
J. Folch Pera
Unidad de Tecnología de la Producción Animal
Servicio de Investigación Agraria
Diputación General de Aragón
Apdo. 727.
50.080 Zaragoza (España)

RESUMEN

Una de las principales limitaciones para la tipificación genética de individuos es la cantidad de ADN presente en la muestra biológica de partida, así como su estado de conservación. En el presente trabajo se compara la eficiencia de diferentes métodos para la extracción de ADN a partir de muestras biológicas de diferente origen y en diferente estado de conservación. La metodología que se describe posibilita la caracterización genética de individuos mediante tecnología PCR ("Polimerase Chain Reaction") a partir de muestras biológicas limitantes o no en contenido de ADN: sangre, tejidos, células bucales y pelos. Asimismo, se ha realizado un estudio del impacto del agente conservante utilizado (etanol o formol) sobre la integridad del ADN de muestras biológicas archivadas procedentes de museos e institutos anatomo-patológicos, y en última instancia, su aptitud para el análisis.

El ejemplo particular que presentamos es la identificación del sexo mediante la amplificación de los loci ZFX/ZFY y posterior análisis de RFLPs ("Restriction Fragment Length Polimorphisms") en diferentes mamíferos. Sin embargo, esta técnica de sexaje a veces presenta problemas para el diagnóstico del sexo en rumiantes, por lo que es frecuente incurrir en una falsa asignación del sexo. Para mejorar la precisión de esta técnica hemos introducido un "control interno" en el análisis de RFLPs que proporciona un inequívoco diagnóstico del sexo: el vector plasmídico pUC18.

Palabras clave: PCR, ZFX/ZFY, sexaje, sangre, tejidos, células bucales, pelos y pUC18.

SUMMARY
DNA TYPING OF INDIVIDUALS BY USING DIFFERENT BIOLOGICAL SPECIMENS: SEX DIAGNOSIS VIA SELECTIVE DNA AMPLIFICATION AND RFLPs ANALYSIS

Nucleic acids content or integrity in biological samples constitute an important limiting factor for DNA typing technology. In the present work, several procedures are

1. Trabajo financiado con proyecto INIA (SC94-073)

2. Correspondencia dirigida

tested for the extraction and purification of DNA from different biological sources at different stages of preservation. The methodology we describe allows PCR-based DNA typing from an assorted range of biological specimens: blood, tissues, buccal cells and follicle hairs. We also have analysed the impact of the preservation method, ethanol or formalin fixation, on DNA integrity from collected archival materials and hence the suitability for genetic surveys.

The particular example we show refers to sex identification in different mammals by using selective amplification of the ZFX/ZFY loci and subsequent RFLPs analysis. However, this technique sometimes presents problems for sex diagnosis in ruminant species. To improve the accuracy of this sex identification method, we have implemented the technique with an appropiate control in the RFLPs analysis that ensures a correct sex assignation: the pUC18 plasmid.

Key Words: PCR, ZFX/ZFY, sexing, blood, tissues, buccal cells, hairs and pUC18.

Introducción

El interés por la tipificación genética de individuos mediante técnicas de genética molecular es cada día más creciente en áreas como las Ciencias Biomédicas, Ciencias Agrarias y Medio Ambiente, debido al impacto que ésta puede tener en aspectos sanitarios, económicos, así como en el mantenimiento de una biodiversidad global. Esta tecnología se ha visto revolucionada mediante la utilización de la técnica de amplificación selectiva de ADN o PCR ("Polymerase Chain Reaction") en campos aplicativos de la ciencia de lo más diverso: Diagnóstico y pronóstico clínico (PERUCHO, 1994; MAHBUBANI y BEJ, 1994; MASSARI *et al.*, 1996; ARRIGO, 1994; D'AURIOL y SIGAUX, 1994), producción y mejora genética animal y vegetal (HETZEL, 1993; MONTGOMERY *et al.*, 1993), diagnóstico forense (BUDOWLE *et al.*, 1994) y conservación de especies en vías de extinción (ARNHEIM *et al.*, 1990; HEDRICK y MILLER, 1992; EHRLICH y WILSON, 1991).

Sin embargo, una de las principales limitaciones que esta tecnología presenta es la cantidad de ADN presente en la muestra biológica de partida, así como su estado de conservación. En el presente trabajo se compara la eficiencia de diferentes métodos de extracción de ADN a partir de muestras biológicas muy diversas que nos permiten llevar a cabo estudios genéticos mediante amplificación selectiva de ADN (PCR) y posterior caracterización con enzimas de restricción (RFLPs). Por consiguiente, nuestro objetivo es disponer de una metodología analítica adaptada a las características de la muestra biológica de partida (sangre, tejidos, células bucales y pelos). Asimismo, se ha hecho un estudio del impacto de algunos métodos de preservación (congelación, etanol y formol) sobre la integridad del ADN de muestras biológicas archivadas, y en consecuencia, su aptitud o no para análisis genéticos utilizando esta tecnología.

Para la validación de los diferentes métodos de extracción de ADN, así como el origen y preservación de las muestras, se ha utilizado la técnica de amplificación selectiva de ADN (PCR) al ser esta reacción enzimática muy vulnerable a la presencia de inhibidores que suelen contaminar las preparaciones de ADN. El ejemplo particular que presentamos es la identificación del

sexo en individuos mediante amplificación de un dominio funcional conservado en mamíferos, "zinc finger domain" (PAGE *et al.*, 1987; SCHENEIDER-GADICKE *et al.*, 1989; PALMER *et al.*, 1989), de los genes ZFX y ZFY localizados en los cromosomas X e Y, respectivamente. La posterior caracterización del producto amplificado con enzimas de restricción producirá un polimorfismo que identificará el sexo (RFLPs) (AASEN y MEDRANO, 1990).

La figura 1 muestra las secuencias nucleotídicas de los loci ZFX (a) y ZFY (b) amplificados por PCR en la especie humana. Asimismo, la figura ilustra el modo en que los oligonucleótidos iniciadores o "primers" (P1-5EZ y P2-3EZ) se aparean con sus secuencias complementarias del ADN molde "desnaturalizado" para que el enzima Taq ADN polimerasa I produzca su extensión en dirección 5'→3'. La secuencia de los "primers" (caja negra en la figura) aparece alineada con su secuencia complementaria en la cadena de ADN molde respectiva.

Utilizando un programa de manipulación de secuencias nucleotídicas se han comparado las secuencias de ADN de los fragmentos ZFY y ZFX amplificados en la especie humana (figura 1 a y b). De 447 pares de bases (pb) alineadas aparecen 25 nucleótidos diferentes, lo que da una homología entre ambas secuencias muy elevada (94.4 %). Los nucleótidos que difieren aparecen marcados en la secuencia amplificada ZFX con un asterisco grande (figura 1a). Hay que destacar que estas diferencias en la composición nucleotídica serán las responsables del polimorfismo que identifique el sexo. Así por ejemplo, el nucleótido en posición 129 del locus ZFY (figura 1b) es un residuo G (guanina), que con sus bases contextuales 5'-GGCC-3', determinan un sitio de reconocimiento para el enzima de restricción Hae III. Por el contrario, este residuo en la misma posición del locus ZFX (figura 1a) está sustituido por una adenina (A), y por consiguiente, la secuencia 5'-AGCC-3' ya no es "diana" de la endonucleasa Hae III, desapareciendo por tanto este sitio de corte. Este polimorfismo generado por la diferente longitud de los fragmentos resultantes de la digestión de los loci ZFX/ZFY amplificados con el enzima de restricción Hae III es lo que se denomina RFLPs o "Restriction Fragment Length Polymorfisms". Por tanto, este enzima de restricción puede ser de utilidad para el diagnóstico del sexo en la especie humana (AASEN y MEDRANO, 1990).

En el caso de pequeños rumiantes, especies ovina y caprina, la idendificación del sexo se puede llevar a cabo con el enzima Sac I que reconoce y corta la secuencia 5'-GAGCTC-3' presente únicamente en el locus ZFX de estas especies. Por el contrario, para el sexaje en la especie bovina se debe utilizar el enzima de restricción Pst I que reconoce y corta la sequencia 5'-CTGCAG-3' del locus ZFY bovino (AASEN y MEDRANO, 1990). Es interesante destacar que en la especie humana el enzima Sac I también produce un polimorfismo que identifica el sexo (locus ZFX); por el contrario, Pst I no lo produce al digerir ambos loci, ZFX y ZFY, en la misma posición (figura 1 a y b).

A pesar de la amplia difusión de esta metodología para el sexaje (AASEN y MEDRANO O, 1990; POLLEVICK *et al.*, 1992), esta técnica produce muchas veces una incorrecta asignación del sexo en especies rumiantes debido a la incompleta o nula actividad del enzima de restricción utilizado en el análisis de RFLPs (ABROL *et al.*, 1993). Así por ejemplo, la digestión parcial del locus ZFX en hembras (ZFX/ZFX) de las especies ovina y caprina con el enzima de restricción Sac I induce a una falsa asignación del sexo, machos en lugar de hem-

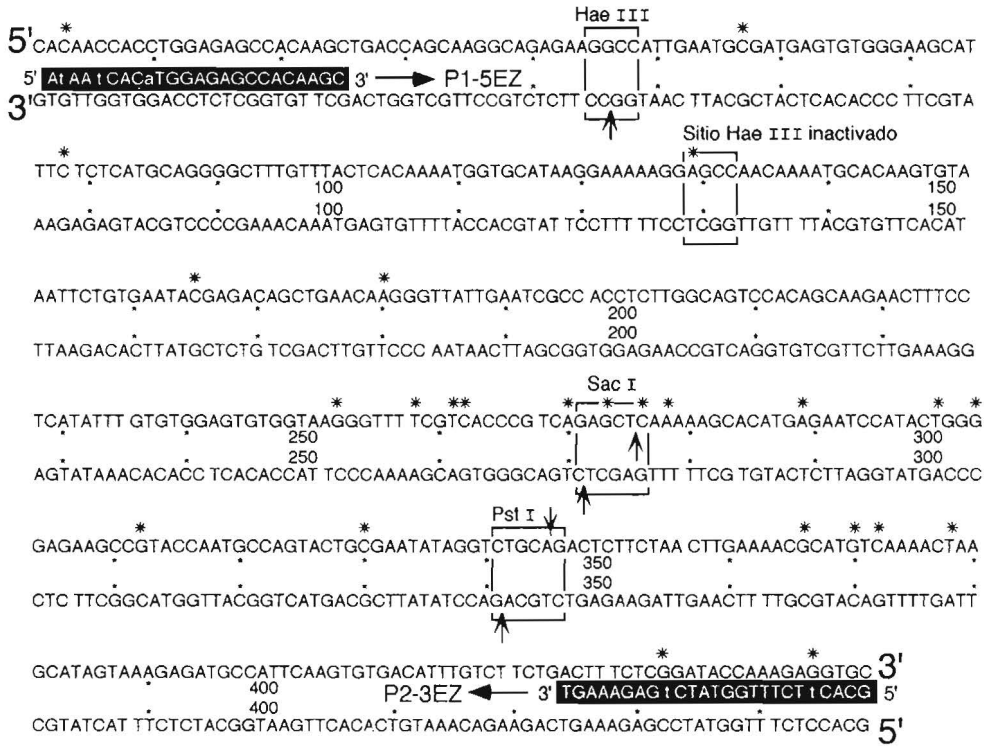


Figura 1 a. Secuencia nucleotídica del fragmento ZFX humano amplificado (447 pb). Nucleotide sequence of the human ZFX amplified fragment (447 bp). Los "primers" (caja negra) aparecen alineados con sus secuencias complementarias en el ADN molde para que el enzima Taq ADN polimerasa I produzca la extensión en dirección 5'→3'. Los asteriscos grandes indican las bases que difieren con respecto a la secuencia homóloga ZFY (figura 1b). Asimismo, aparecen en la secuencia los lugares de reconocimiento para los enzimas de restricción Hae III, Sac I y Pst I. Las flechas verticales indican el lugar de corte (actividad fosfodiesterasa).

bras. Del mismo modo, el no funcionamiento del enzima Pst I en machos (ZFX/ZFY) de la especie bovina produce a su vez un falso diagnóstico del sexo, hembras en lugar de machos.

Como genuinidad del presente artículo, hemos introducido un "control interno" en el análisis de RFLPs que será indicativo del correcto funcionamiento del enzima de restricción utilizado, y en un principio, proporcionará un inequívoco diagnóstico del sexo en rumiantes: el vector plasmídico pUC18 (figura 4). Este vector, dependiendo de la estructura tridimensional que posea, presentará una diferente movilidad electroforética (μ) en el gel de electroforesis. De este modo, el plásmido circular covalentemente cerrado (ccc), o no digerido por el enzima (Pst I o Sac I), presentará una mayor movilidad electroforética que su versión homóloga linearizada o abierta con el mismo enzima (figura 4, línea 4, pUC18 sin digerir con el

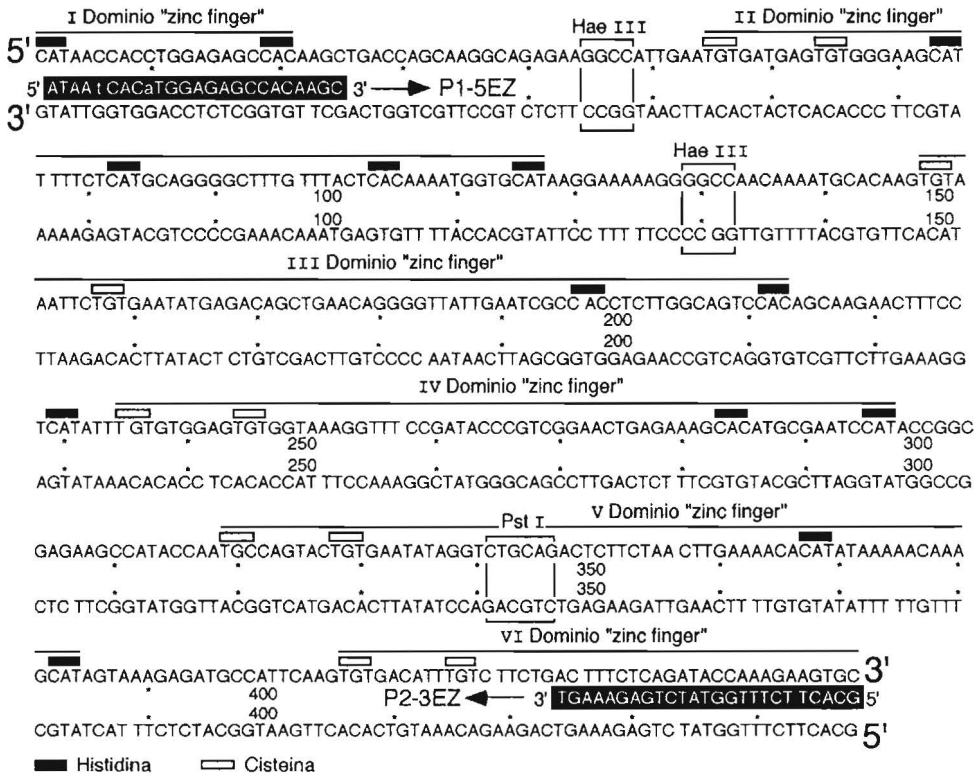


Figura 1 b. Secuencia nucleotídica del fragmento ZFY humano amplificado (447 pb). Nucleotide sequence of the human ZFY amplified fragment (447 bp). En la secuencia se indican los trinucleótidos o "codones" que especifican los aminoácidos histidina y cisteina que participan en la formación del dominio "zinc finger" (barra negra) involucrado en la actividad transcripcional de estos genes. El posicionamiento de estos dominios, aunque no aparece en la figura 1a, es el mismo. También se muestran los sitios de restricción para los enzimas Hae III y Pst I, así como los "primers" (caja negra) que dirigen la amplificación.

enzima; líneas 2 y 3, pUC18 abierto con los enzimas Pst I y Sac I, respectivamente). Asimismo, la presencia de ambas conformaciones del plásmido en el perfil electroforético, abierta y cerrada (ccc), será indicativo de una digestión incompleta con el enzima de restricción.

En la actualidad, estamos utilizando esta tecnología (PCR/RFLPs) para llevar a cabo estudios de genética poblacional en una especie en peligro de extinción en nuestra Comunidad Autónoma: "el bucardo" o cabra montés del Pirineo (*Capra pyrenaica pyrenaica*). En concreto, estamos realizando el sexaje (loci ZFX/ZFY) e identificación de las diferentes subespecies de cabra montés (ADN mitocondrial) a partir de pelos recogidos en su hábitat natural (Parque Nacional de Ordesa y Monte Perdido) o procedentes de museos etnológicos, para la realización de un estudio demográfico y filogenético.

Material y métodos

Muestras biológicas

Como muestras biológicas no limitantes en contenido de ADN, se ha elegido sangre periférica recogida con anticoagulante (EDTA) de las especies humana (*Homo sapiens*), bovina (*Bos taurus:* Parda Alpina), ovina (*Ovis aries:* Rasa Aragonesa) y caprina (*Capra hircus:* Blanca Celtibérica). En el caso de tejidos congelados se utilizó hígado de cabra doméstica (Blanca Celtibérica), y para tejidos conservados en etanol, un testículo de perro (*Canis familiaris:* Braco). Finalmente, para tejidos conservados en formol utilizamos hígado de íbice alpino *(Capra ibex).*

Las muestras biológicas limitantes en cantidad de ADN de origen humano (hombre) fueron células bucales obtenidas por frotis, así como la raíz de pelos de la cabeza o ceja.

Para el aislamiento de ADN bacteriano, se han utilizado 10 ml de cultivo en fase de crecimiento exponencial de *Escherichia coli* DH5α en medio LB (Sigma) .

Extracción de ADN a partir de sangre

A) Preparación de ADN (10 ml de sangre)

Para ello, se utilizó un procedimiento clásico de digestión celular con proteinasa K y posterior extracción de ADN con fenol-cloroformo (SAMBROOK *et al.*, 1989). La cuantificación del ADN aislado se llevó a cabo por espectrofotometría UV (ultravioleta) (260 nm). Finalmente, se hizo un control de la integridad del mismo mediante electroforesis y se utilizó ADN de fago λ (48.5 Kb o kilobases) (Promega), sin cortar o digerido con el enzima de restricción BstE II (*Bacillus stearotermophylus E*), como marcador de pesos moleculares, que a su vez, serviría como método de cuantificación visual del ADN cargado en el gel.

B) Preparación "rápida" de ADN (5-20 µl de sangre)

La obtención de ADN a partir de microgotas de sangre se llevó a cabo utilizando el método rápido de la resina de intercambio iónico "Chelex-100" (figura 2) (WALSH *et al.*, 1991; DE LAMBALLERIE *et al.*, 1992).

Extracción de ADN a partir de tejidos

El procedimiento que se utilizó para la extracción de ADN a partir de tejidos frescos, congelados o conservados (etanol y formol), es una ligera modificación al protocolo inicialmente referido de lisis celular con proteinasa K y extracción de ADN con fenol-clorofomo. La modificación consistió en la homogeneización del tejido en presencia de nitrógeno líquido (HOELZEL y GREEN, 1992). Asimismo, el ADN obtenido fue cuantificado y su integridad inspeccionada por electroforesis (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Métodos NO invasivos de obtención de ADN.

A) Extracción de ADN partir de células bucales (escobillón o "cytobrush")

Para la obtención de ADN extraido a partir de células bucales se ha utilizado el método del "Chelex-100" (WALSH *et al.*, 1991). Para ello, se obtuvieron células epiteliales de la boca mediante frotis con un escobillón estéril en la cavidad bucal. A continuación, el material recogido se depositó en un tubo Eppendorf con 0.5 ml de

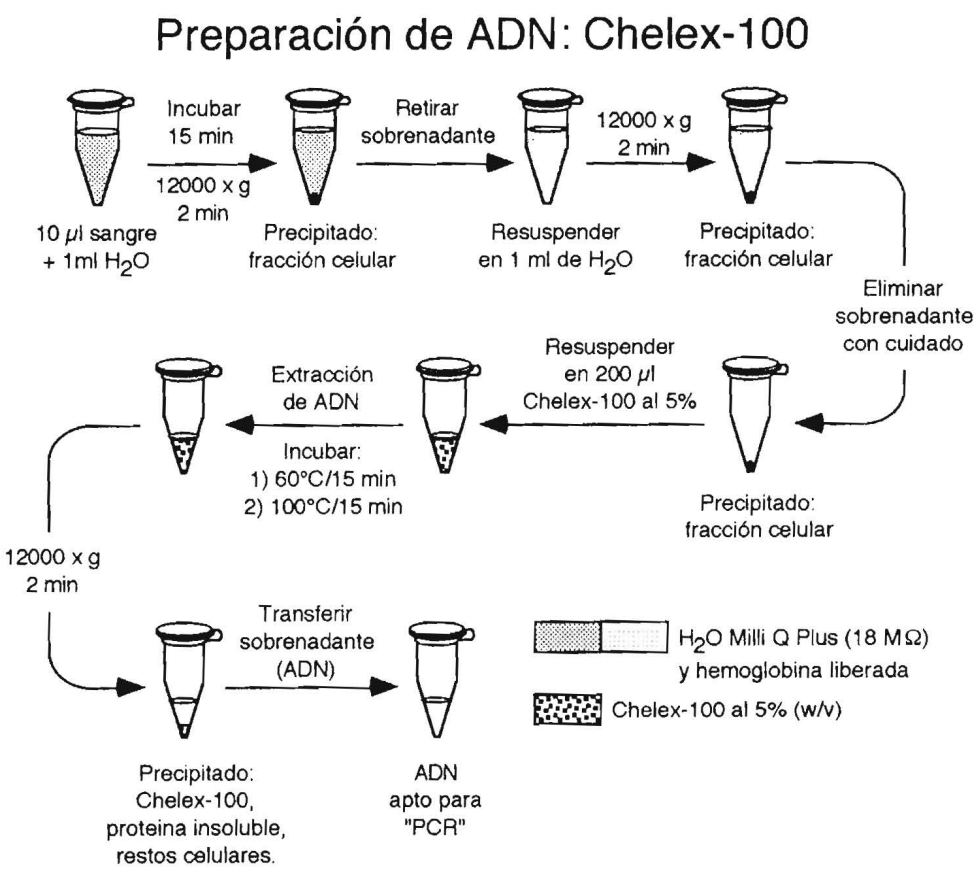


Figura 2. Esquema del procedimiento de extracción de ADN a partir de una microgota de sangre (10 µl) utilizando la resina de intercambio iónico Chelex-100. Diagram showing the Chelex-100 ion exchange resin method to isolate DNA.

agua Milli Q Plus estéril (18 MΩ) y se procedió de acuerdo con el protocolo anteriormente descrito (Preparación "rápida" de ADN a partir de sangre) (figura 2).

B) Extracción de ADN y PCR simultáneo a partir de "pelos"

La extracción de ADN a partir de la raíz de un folículo piloso, se llevó a cabo utilizando el método de digestión con proteinasa K en tubo de reacción "PCR" (HOELZEL and GREEN, 1992). Este tipo de muestras, limitantes en contenido de ADN, exige tomar unas precauciones especiales para evitar una amplificación inespecífica debido a la presencia de ADN contaminante. Para ello, se llevó a cabo la irradiación de algunos componentes de la reacción enzimática con luz UV (λ=302 nm, 15 minutos) para inducir la fotodimerización de residuos de timina: tubo PCR, tampón 10X PCR, solución 25 mM de $MgCl_2$, agua MilliQ Plus, aceite mineral y solución de proteinasa K (YAP *et al.*, 1994). Todas las muestras procedieron de un mismo sujeto (varón) y el análisis se ejecutó tras la recogida de las mismas.

Para la extracción de ADN, se seleccionó un pelo libre de impurezas de la cabeza o ceja, diseccionó la raíz bajo lupa estereoscópica (≤ 0.5 mm longitud) (figura 3) y se introdujo en un tubo Eppendorf de paredes delgadas de 0.5 ml para "PCR" (Advanced Biotechnologies). A continuación, se añadieron 23.5 µl de agua Milli Q Plus estéril, 5 µl de tampón 10X "PCR" (Promega) [1% (v/v) Tritón X-100, KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 9.0], 1.5 µl de proteinasa K (10 mg/ml) (Boehringer Mannheim) y 35 µl de aceite mineral (Sigma, Embryo Tested). La digestión enzimática o extracción de ADN se llevó a cabo a 65°C durante 2 horas. Posteriormente, el enzima y el ADN se desnaturalizaron por tratamiento térmico a 95°C durante 20 minutos y la muestra se mantuvo a 80°C hasta iniciar la amplificación enzimática o "PCR". Para ello, se añadieron 20 µl de mezcla "PCR" que incluyó: 2.5 unidades de Taq ADN polimerasa I, iniciador P1-5EZ 1 µM, iniciador P2-3EZ 1 µM, MgCl2 1.5 mM y los 4 desoxirribonucleótidos 5'-trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), a una concentración de 150 µM

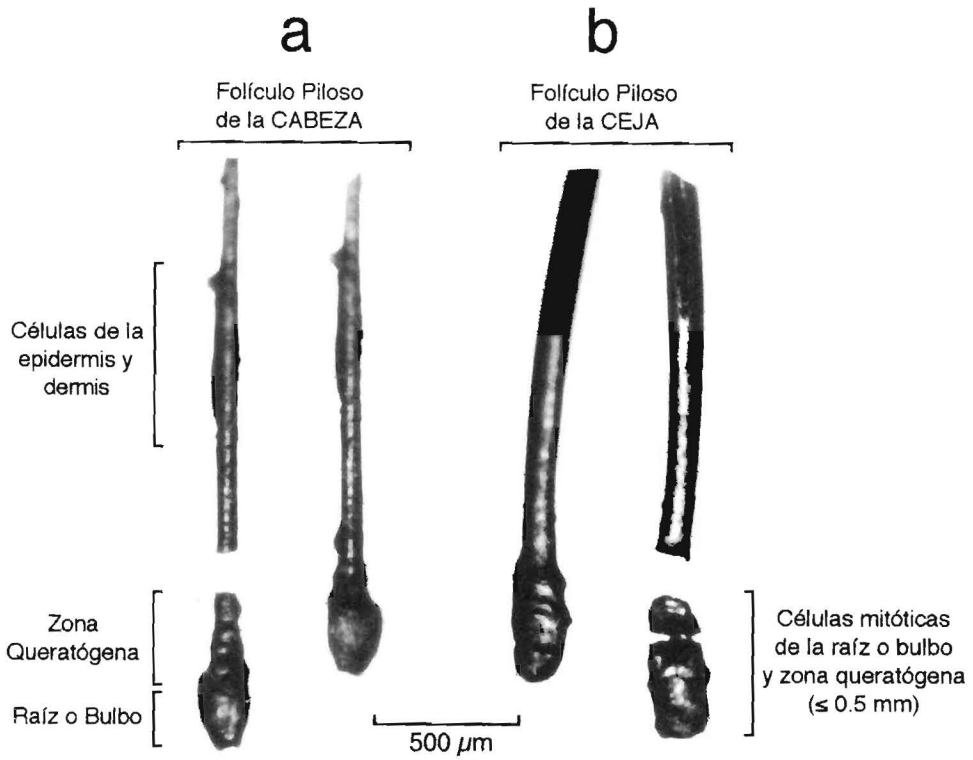


Figura 3. Morfología y estructura de un folículo piloso (66X) aislado de la cabeza (a) y ceja (b) de un hombre. Morphological structure of a head (a) and eyebrow (b) follicle hair (66X) isolated from a man. En la figura se muestra la raíz y zona queratógena adyacente que ha sido diseccionada y utilizada para el sexaje (PCR/RFLPs).

cada uno de ellos. Finalmente, los tubos se colocaron en el termociclador y se procedió con la amplificación enzimática (siguiente apartado).

Amplificación enzimática de los loci ZFX/ZFY: "Polymerase Chain Reaction o PCR"

La amplificación enzimática de los loci ZFX/ZFY se llevó a cabo utilizando un termociclador de la marca MJ Research (Mod. PTC-100) y el enzima Taq ADN polimerasa I aislado de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* (Promega) (BEJ y MAHBUBANI, 1994). Los oligonucleótidos iniciadores o "primers" que han sido utilizados para la amplificación, descritos por AASEN y MEDRANO (1990), fueron los siguientes: 1) P1-5EZ: 5' ata atc aca tgg aga gcc aca agc t 3' (iniciador que promueve la síntesis de la cadena de ADN con sentido, codificante, o "forward primer") y 2) P2-3EZ: 5' gca ctt ctt tgg tat ctg aga aag t 3' (iniciador que produce la extensión de la cadena de ADN sin sentido, complementaria a la anterior, o "reverse primer")] (figura 1 a y b). Los citados "primers" se encargaron a un servicio de síntesis de oligonucleótidos (Pharmacia Biotech).

La reacción se realizó en tubos Eppendorf de 0.5 ml de pared delgada, en un volumen final de reacción de 50 µl y utilizando 50-100 ng de ADN aislado de las muestras biológicas (ADN molde o "template DNA"). La mezcla "PCR 1" (40 µl) estaba constituida por: ADN molde, 0.1% Tritón X-100 (v/v), KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 9.0), $MgCl_2$ 1.5 mM, iniciador P1-5EZ 1 µM e iniciador P2-3EZ 1 µM.

A continuación se añadieron 35 µl de aceite mineral y se inició la desnaturalización del ADN con el programa "hot start PCR": 1) 94°C durante 10 minutos y 2) mantenimiento de la muestra a 80°C. Seguidamente, se añadió a la reacción 10 µl de mezcla "PCR 2" que incluyó el enzima Taq ADN polimerasa I (1.25 unidades) y los 4 desoxirribonucleótidos 5'-trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), a una concentración de 150 µM cada uno de ellos.

La reacción de amplificación (1 ciclo) se desarrolló en tres etapas: 1ª) desnaturalización del ADN (94°C, 1 minuto), 2ª) acoplamiento o hibridación de oligonucleótidos iniciadores a sus secuencias complementarias (60°C, 2 minutos) y 3ª) extensión de los mismos por el enzima Taq ADN polimerasa I (72°C, 2.5 minutos). La amplificación exponencial de los loci ZFX/ZFY se completó con 35 ciclos finalizando con una etapa de extensión final (72°C, 5 minutos). En el caso particular de muestras biológicas pobres en ADN (raíz de un pelo), la amplificación exponencial se prolongó hasta 50 ciclos.

Para comprobar la eficacia del proceso de amplificación, se tomó una alicuota de 10 µl y se analizó por electroforesis en geles de 1% de agarosa (Promega) con bromuro de etidio (SAMBROOK *et al.*, 1989). Concluida la electroforesis, se procedió a la visualización del producto amplificado por fluorescencia bajo una fuente de radiación UV (302 nm, λ) y al fotografiado del gel (Polaroid 667).

Análisis con Enzimas de Restricción de los loci ZFX/ZFY amplificados: "Identificación del sexo"

Una vez amplificados los loci ZFX/ZFY, se procedió a su análisis con enzimas de restricción para la identificación del sexo según la especie. Para ello, nos basamos en el polimorfismo descrito por AASEN y

MEDRANO (1990) utilizando algunos enzimas de restricción ("Restriction Fragment Length Polymorphisms o RFLPs"). En el caso de rumiantes se añadieron 200 ng de vector plasmídico pUC18 (ccc) como control interno en el análisis de restricción (RFLPs).

Para la especie humana, se tomó una alicuota de 20 µl de producto amplificado que fueron digeridos con 20 unidades de enzima Hae III (*Haemophilus aegyptius*) durante 3 horas a 37°C, en un volumen final de reacción de 40 µl. Del mismo modo se procedió con la especie bovina, utilizando el enzima Pst I (*Providencia stuartii*). Finalmente, para las especies ovina y caprina, la digestión enzimática fue con Sac I (*Streptomyces achromogenes*). Todos los enzimas utilizados, así como las especificaciones en su uso, fueron de la firma comercial Promega.

Los fragmentos de restricción obtenidos, 20 µl de la mezcla de digestión anterior, se analizaron posteriormente mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% (NuSieve GTG, FMC Products) (SAMBROOK *et al.*, 1989). La determinación del tamaño de los fragmentos de restricción originados se llevó a cabo utilizando como marcador de pesos moleculares el vector plasmídico pUC18 (200 ng) digerido con el enzima Hae III : 587, 458, 434, 298, 267, 257, 174, 102, 80 y 18 pb (pares de bases) (figura 4, línea 1).

Amplificación de plásmido pUC18 en *Escherichia coli* DH5α y posterior aislamiento

Para ello, el plásmido pUC18 (figura 4) se amplificó en *Escherichia coli* DH5α mediante transformación de la bacteria y crecimiento posterior en medio de cultivo líquido (LB Broth, Sigma) con ampicilina (100 µg/ml) (12-24 h). A continuación, las bacterias fueron lisadas (método alcalino) y el ADN plasmídico circular covalentemente cerrado (ccc) se purificó mediante ultracentrifugación en gradientes autogenerados de CsCl (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Manipulación de las secuencias nucleotídicas importadas de GenBank

Las secuencias nucleotídicas de los cDNAs para los genes ZFY y ZFX humanos (PALMER at al., 1990) se importaron via INTERNET (http://www3.ncbi.nlm.nih.gov) de un banco de genes (GenBank, clave de acceso: M30607 y M30608) y se manipularon con el programa Gene Works® 2.3 ["Nucleic Acid and Protein Sequence Analysis Software" (IntelliGenetics, Inc.)]. La figura 1 a y b, es una simulación de los loci ZFX y ZFY amplificados por PCR.

Resultados

Integridad del ADN aislado a partir de las diferentes muestras biológicas

La integridad del ADN aislado a partir de las diferentes muestras biológicas objeto del estudio, y analizada mediante electroforesis, depende del origen de la mismas, así como del propio método de conservación utilizado.

Cuando se utilizó sangre fresca, se puede observar que el método de extracción con proteinasa K y fenol-cloroformo permite la obtención de fragmentos de ADN de elevado peso molecular (≥ 50 Kb) (figura 5a, líneas 3, 4 y 5: 50, 100 y 150 ng de ADN de *Capra hircus*, respectivamente). Asimismo, se aprecia que este método es igualmente

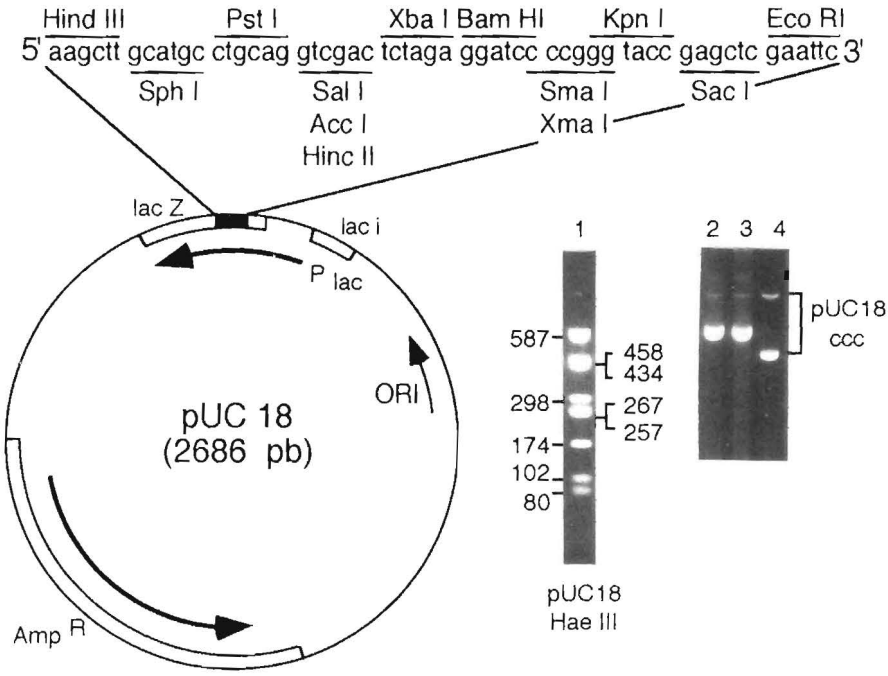


Figura 4. Mapa genético del plásmido pUC18 y comportamiento electroforético en función de su estructura tridimensional. pUC18 genetic map and electrophoretic mobility based on its tridimensional structure. En el mapa figuran los sitios de corte "únicos" para algunos enzimas de restricción, entre ellos Pst I y Sac I, así como el gen que confiere resistencia a ampicilina (Amp^R o Tn1). Asimismo, se muestra el comportamiento electroforético del mismo en función de su estructura tridimensional: línea 4, pUC18 sin cortar (ccc) y líneas 2 y 3, pUC18 abierto o digerido con los enzimas Pst I y Sac I, respectivamente. La línea 1, muestra el vector digerido con el enzima Hae III y utilizado como marcador de pesos moleculares.

efectivo para el aislamiento de ADN bacteriano a partir de un cultivo en fase de crecimiento exponencial (líneas 1 y 2: 150 y 300 ng de ADN de *Escherichia coli* DH5α). Las líneas 6, 7 y 8, representan ADN de fago λ (500, 250 y 100 ng, respectivamente) utilizado como marcador de peso molecular (48.5 Kb) y para estimar visualmente la cantidad de ADN cargada en el gel.

Por el contrario, cuando se utilizaron tejidos congelados o preservados (etanol o formol), la integridad del ADN aislado no fue tan uniforme originándose perfiles electroforéticos muy distintos. En el caso de tejidos congelados, 1 año a -20°C, se aprecia que la mayor parte del ADN aislado fueron fragmentos comprendidos entre los 5 y 50 Kb (figura 5b, líneas 6 y 7: 1 y 2 µg de ADN de hígado de cabra doméstica, respectivamente). Sin embargo, cuando se utilizaron tejidos conservados en etanol, 1 mes a temperatura ambiente, los signos de degradación se hicieron más evidentes pudiéndose observar un bandeado difuminado a lo largo de todo el gel salpicado de oligonucleoso-

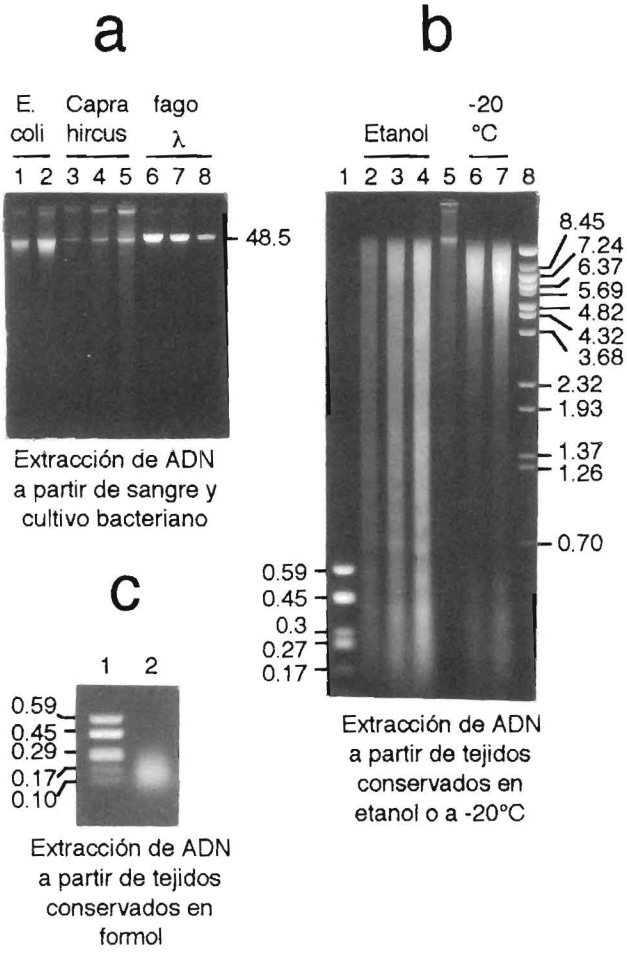


Figure 5. Electroforesis en gel de agarosa mostrando el ADN aislado de diferentes muestras biológicas mediante el método de digestión celular con proteinasa K y posterior extracción con fenol-cloroformo. Agarose electrophoresis gel showing DNA extracted from different biological samples by using the proteinase K and phenol-chloroform extraction procedure. Panel a: ADN aislado de sangre de cabra doméstica (líneas 3-5) y de *E. coli* DH5α (líneas 1 y 2). Panel b: ADN aislado de tejidos conservados un mes en etanol (líneas 2-4: testículo de perro) o un año en congelación (líneas 6 y 7: hígado de cabra doméstica); línea 5. ADN de sangre fresca de cabra doméstica. Panel c: ADN aislado de tejidos conservados un año en formol (línea 2; hígado de íbice alpino). Marcadores de peso molecular: panel a, líneas 6-8 (ADN fago λ de 48.5 Kb); panel b y c, línea 1 (pUC18 digerido con Hae III) y panel b, línea 8 (ADN fago λ digerido con Bst EII).

mas en la zona de 1 a 0.2 Kb (figura 5b, líneas 2, 3 y 4: 1, 2.5 y 5 µg de ADN, respectivamente, de testículo de perro). La extracción de ADN a partir de tejidos frescos mostró un rendimiento e integridad muy similar al de tejidos congelados (no se muestra). Las líneas 1 y 8 son marcadores de pesos moleculares (plásmido pUC18

digerido con el enzima Hae III y ADN de fago λ digerido con el enzima BstE II, respectivamente). La línea 5 muestra ADN de alto peso molecular (≥50 Kb) aislado a partir de sangre de cabra doméstica para un estudio comparativo.

Finalmente, cuando los órganos fueron conservados en formol, 1 año a temperatura ambiente, se puede observar una intensa degradación del ADN quedando todo él reducido a fragmentos de 0.1 a 0.3 Kb (figura 5c, línea 2: 1 µg de ADN de hígado de cabra alpina). Línea 1: marcador de pesos moleculares (pUC18/Hae III).

Validación de los métodos de extracción de ADN y origen de las muestras biológicas: "Amplificación de los loci ZFY y ZFX por PCR"

Todos los métodos de extracción de ADN utilizados, así como el origen y modo de preservación de las muestras biológicas, a excepción de aquellas conservadas en formol, rindieron ADN de calidad aceptable para ser amplificado por PCR.

Para la optimización de la reacción de amplificación de los loci ZFX/ZFY, hemos utilizado ADN de cabra montés aislado de la fracción celular sanguínea por el método de lisis celular con proteinasa K y fenol-cloroformo. Para ello, se diseñó una estrategia en la que diferentes parámetros fueron ajustados: concentración de ADN, dNTPs, $MgCl_2$, "primers", etc. (manuscrito en preparación). El protocolo de amplificación obtenido fue igualmente efectivo para las demás especies objeto de este trabajo, independientemente del origen de la muestra o su estado de conservación (Material y Métodos).

A partir de 50 ng de ADN aislado de la fracción celular sanguínea por el método de lisis celular con proteinasa K y fenol-cloroformo, se ha amplificado por PCR un fragmento de ≈ 0.45 Kb común a todas las especies estudiadas (figura 6a, líneas 3, 4, 6 y 8: hembras para las especies bovina, ovina, caprina y humana, respectivamente: líneas 2, 5, 7 y 9: machos de las especies bovina, ovina, caprina y humana, respectivamente). Hay que destacar que el fragmento amplificado, o banda que aparece en el gel de electroforesis, es doble (ZFX-ZFX y ZFX-ZFY, hembras XX y machos XY, respectivamente). La especificidad del producto amplificado en cada caso se comprobó posteriormente mediante análisis con enzimas de restricción (ver más adelante). Para cada especie estudiada se utilizó un control negativo para detectar la presencia de ADN contaminante en los reactivos (no se muestra). Las líneas 1 y 10 son el marcador de pesos moleculares (pUC18/Hae III).

Con este método de extracción de ADN no encontramos diferencias en el rendimiento de producto amplificado cuando se utilizaron tejidos congelados o conservados en etanol (figura 5b). Por el contrario, no hubo amplificación nítida cuando se utilizó ADN de los tejidos conservados en formol (figura 5c) (datos no publicados).

Asimismo, también se obtuvo un producto PCR de ≈ 0.45 Kb cuando se utilizó ADN aislado de muestras biológicas limitantes de origen humano utilizando el método del Chelex-100 (figura 7a: líneas 2-5, 20 µl de sangre; líneas 6 y 7, células bucales obtenidas por frotis). El rendimiento del producto amplificado fue similar cuando se utilizaron 3 µl (líneas 2 y 4) o 1 µl (líneas 3 y 5) de solución de ADN procedente de la microgota de sangre. Por el contrario, sí hubo mayor diferencia en el rendimiento cuando se utilizó ADN aislado de células bucales (líneas 6 y 7, 2.5 y 5 µl de solución de ADN, respectivamente).

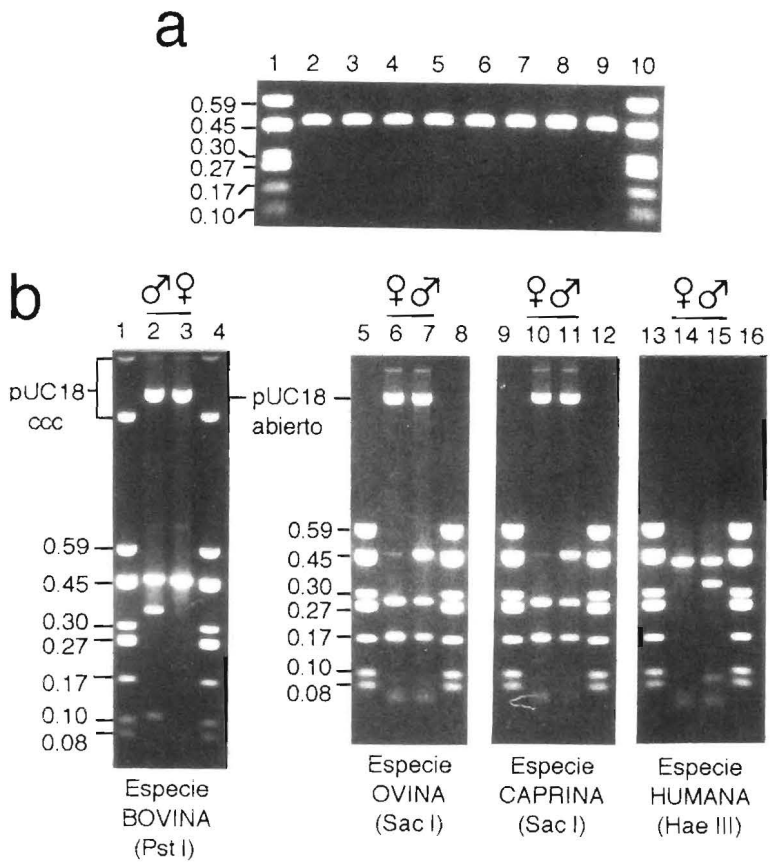


Figura 6. Perfiles electroforéticos mostrando la amplificación por PCR de los loci ZFX/ZFY (a) y posterior identificación del sexo por análisis de RFLPs (b) en las especies bovina, ovina, caprina y humana. ZFX/ZFY PCR amplification (a) and sex diagnosis by RFLPs analysis (b) in the bovine, ovine, caprine and human species. Panel a: loci ZFX/ZFY amplificados por PCR. Líneas 2-3, macho y hembra de la especie bovina; líneas 4-5, 6-7 y 8-9, hembra y macho de las especies ovina, caprina y humana, respectivamente. Las líneas 1 y 10: pUC18 digerido con el enzima Hae III. Panel b: identificación del sexo por análisis de restricción (RFLPs). Líneas 2-3, macho y hembra de la especie bovina identificados con el enzima Pst I. Líneas 6-7 y 10-11, hembra y macho de las especies ovina y caprina, respectivamente, identificados con el enzima Sac I. Líneas 14 y 15, mujer y hombre identificados con el enzima Hae III. Las líneas 1, 4, 5, 8, 9, 12, 13 y 16, pUC18 digerido con Hae III; en las líneas 1 y 4, se añadieron además 100 ng de vector pUC18 ccc (no digerido). Líneas 2, 3, 6, 7, 10 y 11, vector pUC18 abierto que indica el correcto funcionamiento del enzima de restricción.

Sin embargo, cuando se llevó a cabo la extracción de ADN y amplificación consecutiva por PCR en un mismo tubo de reacción utilizando como muestra la raíz de pelos humanos de la cabeza o ceja, los resultados fueron más erráticos. Como se puede observar en el perfil electroforético se obtuvo mayor éxito en la extracción del

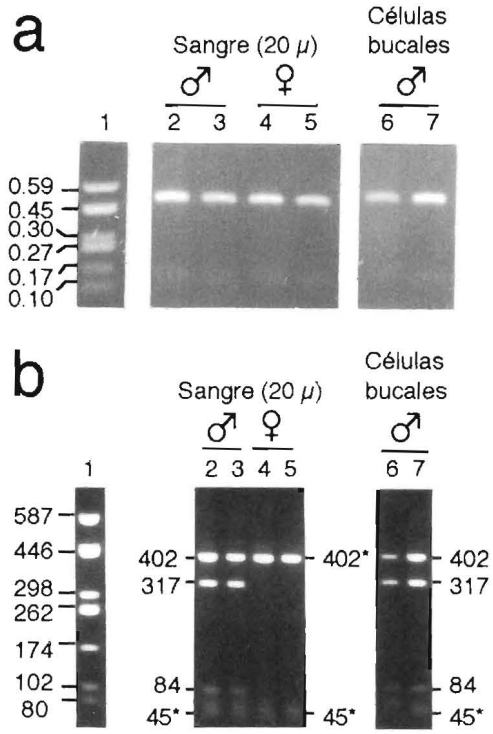


Figura 7. Electroforesis mostrando la amplificación de los loci ZFX/ZFY humanos mediante PCR (a) e identificación del sexo por análisis de RFLPs (b) a partir de ADN obtenido por el método del Chelex-100. PCR amplification of the human ZFX/ZFY loci (a) and sex diagnosis by RFLPs analysis (b) when using the Chelex-100 DNA extraction procedure. Panel a: reacción enzimática de amplificación de los loci ZFX/ZFY a partir de ADN obtenido de una microgota de sangre (líneas 2-5) o células bucales (líneas 6 y 7). Panel b: identificación del sexo mediante RFLPs con el enzima Hae III. Microgota de sangre: líneas 2-3, hombre y líneas 4-5, mujer. Células bucales: líneas 6-7, hombre. Línea 1 (a y b): pUC18 digerido con Hae III.

ADN y posterior amplificación con pelos de la cabeza (3 de 4) (75%) (figura 8: líneas 2, 3 y 4), frente a los procedentes de la ceja (1 de 4) (25%) (línea 12). El bandeado contínuo que aparece en las líneas 5, 13 y 15 son productos inespecíficos o artefactos generados durante el proceso de amplificación exponencial. Las líneas 8 y 9 corresponden a los controles negativos y las líneas 1, 6, 7, 10, 11 y 16 son los marcadores de peso molecular (pUC18/Hae III).

Identificación del sexo: "RFLPs o Restriction Fragment Length Polymorphisms"

Para comprobar la especificidad de los productos PCR obtenidos (loci ZFX/ZFY) a partir de las diferentes muestras biológicas utilizadas, se procedió a su análisis con enzimas de restricción para la identificación del sexo por especie. Para ello, nos basamos en los polimorfismos previamente descritos

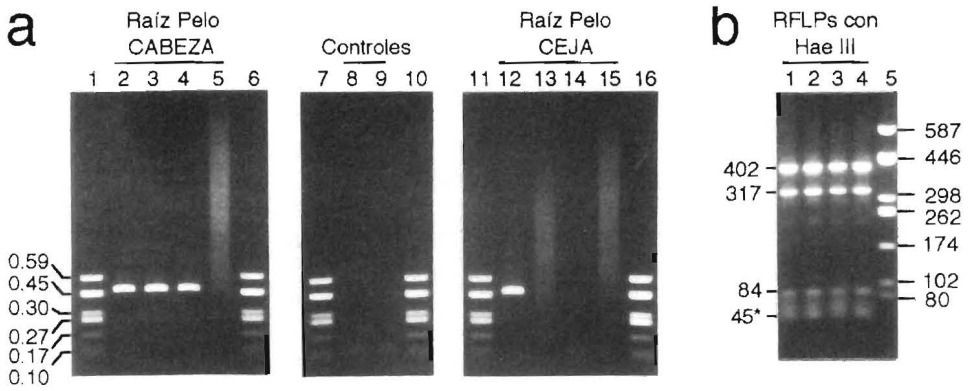


Figura 8. Perfiles electroforéticos de la amplificación de los loci ZFX/ZFY (a) y diagnóstico del sexo mediante RFLPs (b) cuando se utilizó ADN extraido de células de la raíz de un pelo de hombre (cabeza y ceja). PCR amplification of the ZFX/ZFY loci (a) and sex identification by RFLPs analysis (b) when using isolated DNA from a human male follicle hair root (head and eyebrow). Panel a: amplificación de los loci ZFY/ZFX humanos a partir de ADN aislado de la raíz de un pelo de la cabeza (líneas 2-5) o ceja (líneas 12-15). Las líneas 8 y 9 representan los controles negativos (cabeza y ceja, respectivamente). Panel b: identificación del sexo mediante RFLPs con el enzima Hae III. Líneas 1-3: raíz de pelo de cabeza; línea 4: raíz de pelo de ceja. El marcador de pesos moleculares fue pUC18 digerido con Hae III (panel a: líneas 1, 6, 7, 10, 11, 16; panel b: línea 5).

por AASEN y MEDRANO (1990). Nuestros resultados indican que el ADN amplificado fue específico a juzgar por el análisis de restricción realizado y tamaño de los fragmentos obtenidos (RFLPs).

La identificación del sexo en la especie humana se llevó a cabo utilizando el enzima Hae III. Dicho enzima corta el locus ZFY (447 pb) en dos sitios originando tres fragmentos de restricción (317, 84 y 45 pb). Sin embargo, el locus ZFX (447 pb) sólo presenta un sitio de corte para este enzima originando por tanto dos fragmentos de restricción (402 y 45 pb) (figura 1 a y b). De este modo, un hombre (ZFX/ZFY) presentará cuatro bandas en el gel (402, 317, 84, 45 y 45 pb) [figura 6b, línea 15 (sangre); figura 7b, líneas 2-3 (microgota de sangre) y 6-7 (células bucales); figura 8b, líneas 1-3 (pelos de la cabeza) y línea 4 (pelo de la ceja)]. Por el contrario, una mujer (ZFX/-ZFX) sólo originará dos bandas en el perfil electroforético (402, 402, 45 y 45 pb) [figura 6b, línea 14 (sangre); figura 7b, líneas 4-5 (microgota de sangre)].

En el caso de pequeños rumiantes, se utilizó el enzima Sac I que sólo corta el locus ZFX en un único sitio originando dos fragmentos de 274 y 173 pb. Por tanto, un individuo macho (ZFX/ZFY) presentará 3 bandas en el gel (447, 274 y 173 pb) [figura 6b: líneas 7 (ovino) y 11 (caprino)]; y por el contrario, una hembra (ZFX/ZFX) sólo originará 2 bandas de mayor intensidad en el perfil electroforético (274, 274, 173 y 173 pb) [figura 6b: líneas 6 (ovino) y 10 (caprino)].

Para la identificación del sexo en la especie bovina se utilizó el enzima Pst I que corta únicamente el locus ZFY originando dos fragmentos de 344 y 103 pb. En este

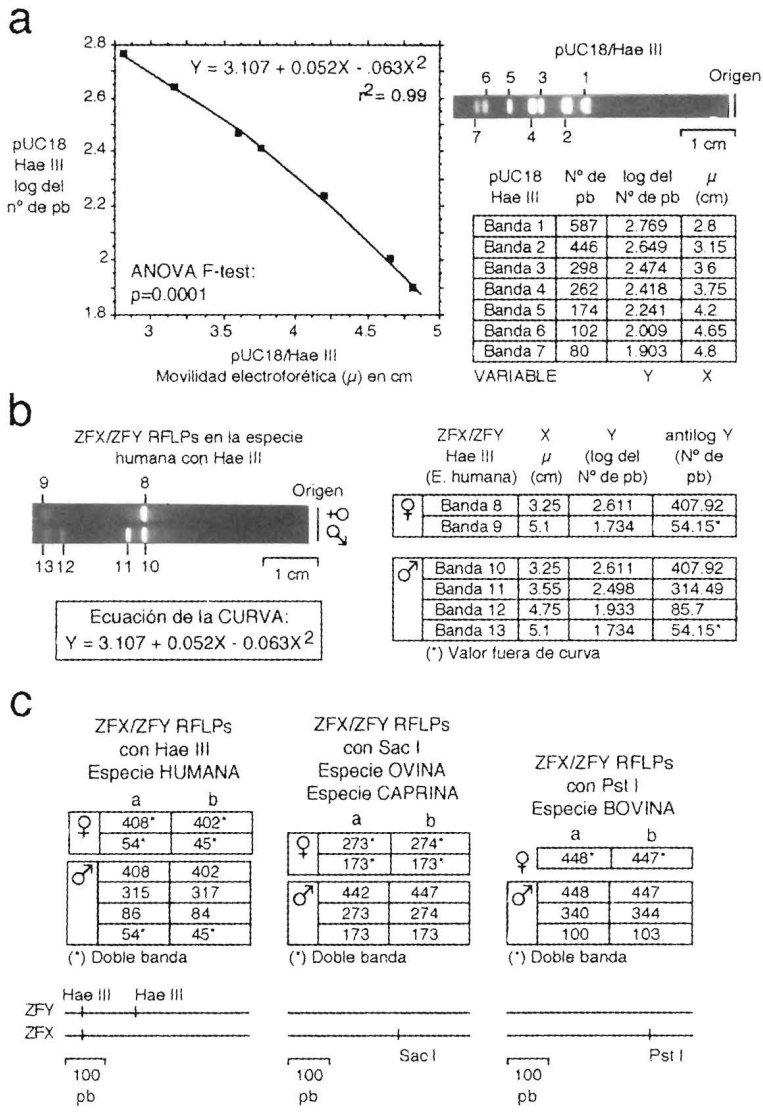


Figura 9. Procedimiento utilizado para el cálculo del tamaño (pb) de los fragmentos de restricción obtenidos en el análisis de RFLPs a partir de los loci ZFX/ZFY amplificados en cada una de las especies estudiadas. Method to determine the restriction fragments size (bp) originated from the RFLPs analysis of the amplified ZFX/ZFY loci in the different species under study. Panel a: obtención de la ecuación que determina el mejor ajuste entre el tamaño (log pb) y la movilidad electroforética (μ) del marcador de pesos moleculares (pUC18 digerido con Hae III). Panel b: cálculo del tamaño (pb) de los RFLPs originados con Hae III a partir de los loci ZFX/ZFY humanos. El panel c resume el tamaño (pb) de los diferentes fragmentos obtenidos en el análisis de RFLPs para el sexo de las diferentes especies estudiadas [columna a: utilizando nuestro método; columna b: tamaños inferidos por secuenciación].

caso, el macho bovino (ZFX/ZFY) presentará 3 bandas en el gel (447, 344 y 103 pb) (figura 6b: línea 2). Por el contrario, una hembra (ZFX/ZFX) presentará ambos loci íntegros (447 y 447 pb) por lo que darán una única banda en el gel (figura 6b: línea 3).

Asimismo, para la correcta asignación del sexo en las especies bovina, ovina y caprina, se ha utilizado el comportamiento electroforético del plásmido pUC18 como indicador del correcto funcionamiento del enzima de restricción utilizado para el sexaje (figura 4). De este modo, se puede apreciar que la digestión con el enzima de restricción correspondiente de los loci ZFX/ZFY amplificados, así como el vector pUC18 introducido como control, fue aparentemente completa al encontrarse este último en su forma abierta o de menor movilidad electroforética [figura 6b: líneas 2 y 3 (especie bovina); líneas 6 y 7 (especie ovina) y líneas 10 y 11 (especie caprina)].

Finalmente, para confirmar la especificidad de los RFLPs obtenidos en este trabajo, se calculó del tamaño de los diferentes fragmentos de restricción originados a partir de la digestión los loci ZFX/ZFY amplificados en cada una de las especies estudiadas y se compararon con los polimorfismos previamente descritos por AASEN y MEDRANO (1990). Para ello, utilizando el tamaño (log pares de bases) (Y) y la movilidad electroforética (migración en el gel en cm) (X) de los fragmentos de restricción del marcador de pesos moleculares (pUC18 digerido con Hae III), se construyó un diagrama de coordenadas rectangulares (X,Y) y se obtuvo la ecuación polinómica de segundo orden que presenta un mejor ajuste (figura 9a). Con esta ecuación y los valores de movilidad electroforética (cm) de los diferentes fragmentos de restricción obtenidos (RFLPs) a partir de los loci ZFX/ZFY de las diferentes especies estudiadas, se ha estimado con suficiente exactitud el tamaño de los mismos en pares de bases (figura 9b, cálculo del tamaño de los RFLPs para los loci ZFY y ZFX humanos). La figura 9c resume los tamaños (pb) de los diferentes RFLPs obtenidos a partir de los loci ZFY y ZFX amplificados en las diferentes especies [columna a, determinación del tamaño (pb) mediante nuestro método; columna b, tamaños inferidos por secuenciación (AASEN y MEDRANO, 1990; PALMER *et al.*, 1990 y POLLEVICK *et al.*, 1992)].

Discusión

El objetivo del presente trabajo es comparar la eficiencia de diferentes métodos de extracción de ADN a partir de una colección de muestras biológicas muy diversas, limitantes o no en contenido de ADN, y en diferentes estados de conservación. Todos los métodos descritos producen ADN de suficiente calidad para su posterior caracterización molecular por PCR/RFLPs y están adecuados al tipo de muestra biológica utilizada.

Cuando la cantidad de muestra biológica no es un factor limitante, el método de elección para la extracción de ADN posiblemente sea el que utiliza proteinasa K y fenol-cloroformo (SAMBROOK *et al.*, 1989). La principal ventaja del método radica en la desproteinización de la muestra, y en consecuencia, una mejor preservación del ADN y ARN aislado (inactivación de nucleasas). Asimismo, está especialmente indicado para muestras de alto valor biológico donde un clonado posterior del ADN extraido suele realizarse para la obtención de una librería genómica (por ejemplo, especies en vías de extinción). A su vez, la integridad del ADN obtenido es bastante aceptable y posibilita la amplificación de grandes frag-

mentos de ADN (20-40 Kb) ("long PCR") (CHENG *et al.*, 1994).

Merece la pena destacar los evidentes signos de degradación del ADN cuando se utilizaron tejidos conservados en etanol (1 mes), y en particular, la presencia de oligonucleosomas que recuerdan los síntomas de muerte celular programada o "apoptosis" (SCHWARTZMAN y CIDLAWSKI, 1993) (figura 5b). A pesar de esta moderada degradación, no se alteró significativamente el rendimiento de la reacción de amplificación o PCR. Por el contrario, la conservación prolongada de muestras biológicas en formol produce una drástica degradación del ADN, fragmentos de 0.1 a 0.3 Kb (figura 5c), cuando se compara con el mismo tejido conservado en congelación por un periodo de tiempo similar (1 año) (figura 5b). Este ADN tan degradado resultó ser un sustrato ineficiente para la amplificación de los loci ZFX/ZFY (≈ 0.45 Kb), aunque podría ser susceptible de análisis por PCR en el caso se secuencias más cortas de 0.1-0.2 Kb (por ejemplo, microsatélites). Por tanto, el formol, de uso rutinario en histopatología y considerado como un excelente fijador de proteínas, no parece ser el agente fijador más idóneo para la preservación prolongada del ADN (JACKSON *et al.*, 1991).

Nuestros resultados sobre integridad del ADN aislado parecen indicar que la congelación de la muestra biológica sería la opción por excelencia para una preservación prolongada del ADN (figura 5b). Alternativamente, la conservación de la muestra en etanol y a temperatura ambiente es también efectiva aunque se aprecie una moderada degradación del ADN con el tiempo. En este sentido, en nuestro laboratorio se están procesando muestras de hígado y músculo de cabra montés que llevan 2 años almacenadas en etanol absoluto a temperatura ambiente, y aunque se observa una moderada degradación del ADN aislado se pueden apreciar fragmentos que van de los 50 a 5 Kb. Estas muestras se están utilizando con éxito para la amplificación de la zona de control del ADN mitocondrial (1.5 Kb) con objeto de hacer un estudio filogenético en esta especie (resultados sin publicar).

Cuando se utilizaron muestras biológicas limitantes en contenido de ADN, una microgota de sangre o células bucales obtenidas por frotis, se utilizó el procedimiento de la resina de intercambio iónico Chelex-100 para la extracción de ADN (WALSH *et al.*, 1991). El Chelex-100 actúa eliminando de la muestra los metales pesados que son inhibidores de la actividad del enzima Taq ADN polimerasa I por desplazamiento de su cofactor metálico inorgánico (Mg^{2+}). Este método de extracción es rápido y sencillo (1 hora) y produce una mínima pérdida de ADN durante el procesado por lo que es ideal para este tipo de muestras biológicas. La integridad del ADN aislado no se verificó al ser la técnica electroforética (tinción con bromuro de etidio) poco sensible, aunque su calidad fue aceptable para la amplificación por PCR (loci ZFX/ZFY). Este tipo de muestras biológicas permite un número limitado de ensayos PCR cuando se compara con el anterior. De este modo, y con nuestras condiciones experimentales, se pueden realizar hasta 100-150 amplificaciones por PCR a partir de una microgota de sangre (20 µl). Por el contrario, existe una mayor limitación en el contenido de ADN en células bucales por lo que un menor número de ensayos PCR puede llevarse a cabo (25-50 amplificaciones) (figura 7).

El tercer método que presentamos, extracción directa de ADN en tubo de reacción PCR (proteinasa K) y posterior amplificación enzimática, está justificado cuando la muestra biológica es claramente limitante

en contenido de ADN (raíz de un pelo). De este modo, la totalidad del ADN extraido de la muestra biológica se utiliza para una única amplificación enzimática o PCR. Nuestros resultados indican una mayor eficiencia para el sexaje cuando se utiliza la raíz de un pelo de la cabeza (75%) en lugar de la raíz de un pelo de la ceja (25%) (figura 8). Esta diferencia en la eficiencia posiblemente obedece a la diferente estructura del folículo piloso en cada caso (figura 3), así como la posible presencia de inhibidores del enzima Taq ADN polimerasa I. Esta última hipótesis se basa en que el sexaje a partir de 2 o más raíces de pelo producen una drástica reducción de la eficiencia del análisis a pesar de ser mayor la cantidad de ADN presente en la reacción (resultados sin publicar). Es por tanto evidente que una limitación del método es la posible persistencia en el tubo de reacción PCR de algún inhibidor del enzima Taq ADN polimerasa I resistente a la degradación proteolítica inespecífica (proteinasa K) y tratamiento térmico. En el caso particular de pelos, se ha descrito que la melanina es uno de ellos (YOSHII *et al.*, 1993), por lo que se han sugerido métodos alternativos de extracción de ADN y posterior amplificación por PCR (WILSON *et al.*, 1995; LIN *et al.*, 1995).

El protocolo consenso de sexaje que presentamos en diferentes especies, mediante amplificación de los loci ZFY/ZFX y su posterior análisis por RFLPs, se ajusta a las condiciones experimentales de nuestro laboratorio, y no difiere mucho del procedimiento descrito por AASEN y MEDRANO (1990). En particular, nuestro protocolo mejora la sensibilidad del análisis por lo que permite utilizar menor cantidad de ADN, diez veces menos en el caso de sangre, así como una menor cantidad de enzima (1.25 unidades de Taq ADN polimerasa I). Por otra parte, y con objeto de mejorar la especificidad del ensayo, se inicia la amplificación selectiva de ADN en caliente ("hot start PCR") por lo que se reducen los riesgos de amplificación inespecífica ("mis-priming") y de formación de artefactos con los "primers" ("primer-oligomerization"). Asimismo, para el sexaje de muestras biológicas limitantes (raíz de un pelo) la amplificación exponencial de los loci ZFX/ZFY se llevó a cabo con 50 ciclos PCR y 2.5 unidades de enzima obteniéndose unos resultados satisfactorios.

En todas las especies estudiadas se ha amplificado un fragmento de $\approx$ 0.45 Kb que corresponde al tamaño esperado de los loci ZFX/ZFY (figura 6a). La identificación del sexo se realizó mediante análisis con enzimas de restricción (RFLPs). Como novedad y con objeto de mejorar la precisión de esta técnica de sexaje, al producirse con cierta frecuencia una incorrecta asignación del sexo en rumiantes por fallo en la digestión con el enzima de restricción (ABROL *et al.*, 1993), hemos introducido un control interno en el análisis de RFLPs: el vector plasmídico pUC18 (figura 6b). Por otra parte, la utilización de este vector como marcador de pesos moleculares (pUC18/Hae III) (figura 4) abarata el costo del análisis al prescindirse de marcadores de origen comercial y resulta ser muy eficiente para la determinación del tamaño (pb) de los RFLPs obtenidos (figura 9).

Finalmente, en el presente trabajo se describe la tipificación genética de individuos (sexaje) a partir de muestras biológicas obtenidas por un método "no invasivo" (pelos y células bucales). En este sentido, debemos decir que esta práctica será en un futuro próximo de amplia difusión en laboratorios de análisis genéticos al ajustarse en mejor medida a los derechos y normas de protección de animales de experimentación, producción y compañía.

Agradecimientos

Al Dr. José A. Cebrián, la Dra. Teresa Muiño e Inmaculada Gargallo, Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Veterinaria (Zaragoza), por el préstamo inicial de "primers", así como por algunos consejos técnicos. A la Dra. Valérie Manceau (Laboratoire de Biologie des Populations d´Altitude, Université Joseph Fourier, Grenoble) por la cesión de muestras de íbice alpino. A José Mª Ruiz Maccione por la asistencia técnica en algún experimento. A Pilar Sánchez por su asistencia en la preparación del material fungible y reactivos. Y finalmente, a Jesús Luis Yániz por la revisión crítica del artículo.

Michel Villalta disfruta de un contrato de reincorporación del M.E.C. (B.O.E. 195, 16 de agosto de 1994).

Bibliografía

AASEN, E. and MEDRANO J.F., 1990. Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. Bio/Technology 8:1279-1281.

ABROL et al., 1993. Excess PCR primers inhibit DNA cleavage by some restriction endonucleases. BioTechniques 15:630-632.

ARNHEIM N., WHITE T. and RAINEY W. E., 1990. Application of PCR: organismal and population biology. BioScience 40:174-182.

ARRIGO S. J., 1994. Assesment of therapy effectiveness: infectious disease, 344-356. In "The Polymerase Chain Reaction", K. B. Mullis, F. Ferré, R. A. Gibbs. Ed. Birkhauser Boston. Cambridge, MA02193, USA.

BEJ, A.K. and MAHBUBANI, M.H., 1994. Thermostable DNA polymerases for in vitro DNA amplifications. 219-237. In "PCR Technology: Current Innovations", Griffin HG and Griffin AM. Ed. CRS Press, Inc. Boca Raton, Florida.

BUDOWLE B., SAJANTILA A., HOCHMEISTER M. N. and COMEY C. T., 1994. The application of PCR to forensic sciences, 244-256. In "The Polymerase Chain Reaction", K. B. Mullis, F. Ferré, R. A. Gibbs. Ed. Birkhauser Boston. Cambridge. MA02193, USA.

CHENG S., CHANG S. Y., GRAVITT P. and Respess R., 1994. Long PCR. Nature 369:684-685.

D'AURIOL L. and SIGAUX F., 1994. The detection of minimal residual disease (MRD) in acute lymphoblastic leukemia using clone-specific probes directed against V(D)J junctional sequences, 335-343. In "The Polymerase Chain Reaction", K. B. Mullis, F. Ferré, R. A. Gibbs. Ed. Birkhauser Boston, Cambridge, MA02193, USA.

DE LAMBALLERIE, X.; ZANDOTTI, C.; VIGNOLI, C.; BOLLET, C. and DE MICCO, P., 1992. A one-step microbial DNA extraction method using "Chelex-100", suitable for gene amplification. Res Microbiol. 143:785.

EHRLICH P. R. and WILSON E. O., 1991. Biodiversity studies: science and policy. Science 253:758-762.

HEDRICK P. W. and MILLER P., 1992. Conservation genetics: techniques and fundamentals. Ecological Applications 2:30-46.

HETZEL J., 1993. Livestock genome research on the march. Nature genetics 4:327-328.

HOELZEL, A.R. and GREEN, A., 1992. Analysis of population-level variation by sequencing PCR-amplified DNA, 159-187. In "Molecular Genetic Analysis of Populations A Practical Approach"; Hoelzel AR. Ed. IRL Press at Oxford University Press, NY.

JACKSON D. P., HAYDEN J. D. and QUIRKE P., 1991. Extraction of nucleic acid from fresh and archival material, 29-50. In "PCR A Practical Approach"; McPherson MJ, Quirke P and Taylor GR. Ed. IRL Press at Oxford University Press, NY.

LINN Z., KONDO T., MINAMINO T., OHTSUJI M., NISHIGAMI J., TAKAYASU T. and OHSHIMA T., 1995. Sex determination on mummies discovered at Taklamakan desert in 1912. Forensic Sci. Int. 75:197-205.

MAHBUBANI M. H. and BEJ A. K., 1994. Applications of polymerase chain reaction methodology in clinical diagnostics, 307-326. In "PCR Technology: Current Innovations", Griffin HG and Griffin AM. Ed. CRS Press, Inc. Boca Raton, Florida.

MASSARI A., NOVELLI G., COLOSIMO A., SANGIUOLO F., PALKA G., CALABRESE G., CAMURRI G., GHIRARDINI G., MILANI G., GIORLANDINO C., GAZZANELLI G., MALATESTA M., ROMANINI C. and DALLAPICOLA B., 1996. Non-invasive early prenatal molecular diagnosis using retrieved transcervical trophoblast cells. Hum. Genet. 97:150-155.

MONTGOMERY G. W., CRAWFORD A. M., PENTY J. M., DODDS K. G., EDE A. J., HENRY H. M., PIERSON C. A., LORD E. A., GALLOWAY S. M., SCHMACK A. E., SISE J. A., SWARBRICK P.A., HANRAHAN V., BUCHANAN F. C. and HILL D. F., 1993. The ovine Booroola fecundity gene (FecB) is linked to markers from a region of human chromosome 4q. Nature Genetics. 4: 410-414.

PAGE D. C., MOSHER R., SIMPSON E.M., FISHER E.M.C., MARDON G., POLLACK J., MCGILLIURAY B., DE LA CHAPELLE A. and BROWN M.C., 1987. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. Cell 51: 1091-1104.

PALMER M.S., BERTA P., SINCLAIR A.H., PYM B. and GOODFELLOW P.N., 1990. Comparison of human ZFY and ZFX transcripts. Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 1681-1685.

PALMER M.S., SINCLAIR A.H., BERTA P., ELLIS N.A., GOODFELLOW P.N., ABBAS N.E. and FELLOUS M., 1989. Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. Nature 342: 927-939.

PERUCHO M., 1994. PCR and Cancer Diagnostics: detection and characterization of single point mutations in oncogenes and antioncogenes. 369-394. In "The Polymerase Chain Reaction". K. B. Mullis, F. Ferré, R. A. Gibbs, Ed. Birkhauser Boston, Cambridge, MA02193, USA.

POLLEVICK G.D., GIAMBIAGI S., MANCARDI S., DE LUCA L., BURRONE O., FRASH AC.C. and UGALDE R. A., 1992. Sex determination of bovine embryos by restriction fragment length polymorphisms of PCR amplified ZFX/ZFY loci. Bio/Technology 10: 805-807.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. and MANIATIS T., 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.

SCHNEIDER-GADICKE A., BEER-ROMERO P., BROWN L. G., NUSSBAUM R. and PAGE D. C., 1989. ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation. Cell 57:1247-1258.

SCHWARTZMAN R. A. and CIDLOWSKI J. A., 1993. The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. Endocr. Rev. 14: 133-151.

YAP E.P.H., LO Y.M.D., FLEMING K.A. and MCGEE J.O'D., 1994. False-positives and contamination in PCR, 249-258, in "PCR Technology: Current Innovations", Griffin HG and Griffin AM. Ed. CRS Press, Inc. Boca Raton, Florida.

YOSHII T., TAMURA K., TANIGUCHI T., AKIYAMA K. and ISHIYAMA I., 1993. Water-soluble eumelanin as a PCR-inhibitor and a simple method for its removal. Jpn. J. Legal Med. 47: 323-329.

WALSH, P.S.; METZGER, D.A. and HIGUCHI, R., 1991. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. BioTechniques, 10:506-513.

WILSON M. R., POLANSKEY D., BUTLER J., DIZINNO J. A., REPLOGLE J. and BUDOWLE B., 1995. Extraction, PCR amplification and sequencing of mitochondrial DNA from human hair shafts. BioTechniques 18: 662-669.

(Aceptado para publicación el 21 de mayo de 1996)

ITEA (1996), Vol. 92A N.º 2, 115-125

LEGIBILIDAD Y COMPRENSIÓN DE PUBLICACIONES DIRIGIDAS A PRODUCTORES Y EXTENSIONISTAS EN ZACATECAS, MÉXICO

MC. G. Galindo González

Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales y Agropecuarias
Apdo. Postal N.º 18
Calera de Víctor Rosales, Zacatecas, México
CP 98500

RESUMEN

En el estado de Zacatecas, México, en el primer semestre de1995 se elaboró un estudio con el objetivo de conocer el grado de legibilidad y comprensión de las publicaciones denominadas: Folletos para Productores y Desplegables, así como para determinar su contenido y presentación; estas series fueron elaboradas por el personal del Programa de Divulgación Técnica del Campo Experimental Calera, dependiente del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Para medir su legibilidad se aplicó la fórmula de R. Flesch, adaptada al español y que incluye tres variables: número de palabras, número de sílabas y número de oraciones. En lo que respecta a la comprensión, se empleó el método propuesto por Hermesdorf, que incluye el uso de un "Vocabulario Básico". Para la caracterización de aspectos formales de las publicaciones se tomaron en consideración diferentes indicadores. Los resultados mostraron que se publicaron 20 desplegables y 42 folletos, que trataron temas relacionados con cultivos básicos, frutales y hortalizas. El mayor porcentaje de los folletos fueron redactados en "Prosa normal", "Fácil" y "Sumamente fácil", adecuados para productores de bajo nivel de escolaridad; sin embargo, esto no ocurrió con los desplegables, ya que fueron redactados en "Prosa sumamente difícil" y "Difícil". Por lo que respecta a la comprensión, la mayoría de las publicaciones se ubicaron en "mediana", no apta para receptores con bajo grado de escolaridad.

Palabras claves: Transferencia, Divulgación, Extensión.

SUMMARY
LEGIBILITY AND COMPREHENSION OF PUBLICATIONS FOCUSED TO FARMING AND TECHNICAL ASSISTANT IN ZACATECAS, MEXICO

In the state of Zacatecas, Mexico, in the first semester of 1995 a study was elaborated with the objetive of knowing the degree of legibility and comprehension of the publications: Booklets and Triptyches for peasants, as well as to determine their content and presentation. These sequences were elaborated by the staff of the Technical Advisory service Programme of the Calera Experimental Station, dependent on the National Institute of Forest and Agricultural Research to measure the legibility. The formulation of R. Flesch was applied and adapted to the Spanish including three variables: number of words, number of syllables and number of sentences. Concerning the comprehension, the method proposed by Hermesdorf was applied, that includes the

use of a Basic Vocabulary. For the characterization of the formal aspearance of publications different indicators were taken into consideration. The result showed that 20 Triptych and 42 Booklets were published, dealing with topics related to basic cultivation, fruit-bearing and vegetables. The larger percentage of the Booklets were written in "normal prose", "easy" and "extremely easy", adapted for peasants with low level of schooling. However, this did not occur with the Triptyches, since they were drafted in extremely difficult and Difficult language. With respect to the comprehension, most of them were located as "average", not suitable for peasants with low level of schooling.

Key Words: Transference, Advisory service, Extension.

Introducción

En México, el reto científico y tecnológico para modernizar y hacer más eficiente la actividad agropecuaria y forestal lo afronta la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, a través del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP); éste último cuenta a nivel nacional con una red de 81 Campos Experimentales (MÉXICO, 1994a).

Específicamente, en el estado de Zacatecas (que se localiza en la región central de la República Mexicana), se tiene instalado el Campo Experimental Calera (CECAL), dependiente del INIFAP. Este Campo Experimental se fundó en el mes de agosto de 1971, y tiene como área de influencia los Distritos de Desarrollo Rural de: Concepción del Oro, Río Grande, Zacatecas, Fresnillo, Jerez y Ojocaliente.

El objetivo principal del CECAL, es formular y ejecutar el Programa Estatal de Investigación Agropecuaria y Forestal, de acuerdo a las políticas y estrategias de los programas de desarrollo de corto y mediano plazo del sector; para lograr lo anterior, se tiene establecida una estrategia que contempla las siguientes etapas: a) diagnóstico y jerarquización de problemas; b) generación de alternativas; c) validación técnica y económica de la tecnología generada; d) divulgación masiva; y e) evaluación sobre el impacto de la tecnología difundida.

En la actualidad, en este Campo Experimental se tienen establecidos 16 programas de investigación, en los cuales laboran 23 investigadores a tiempo completo.

Desde la creación del CECAL, ha existido como apoyo a las tareas de transferencia de tecnología el Programa de Divulgación Técnica, cuyo objetivo ha sido procesar y adecuar la información resultante de la investigación, para difundirla por diferentes medios de comunicación social (prensa, radio, televisión, demostraciones, exposiciones, audiovisuales y publicaciones, entre otros). Los receptores de este conocimiento han sido los técnicos y funcionarios de las instituciones relacionadas con el desarrollo rural, agricultores, ganaderos y público en general.

De los medios más usados por el CECAL, los escritos son los que han recibido mayor apoyo institucional, ya que es el principal medio a través del cual se dan a conocer los resultados de las investigaciones. Las publicaciones que se editan se clasifican en diferentes colecciones, según el tipo de contenido, éstas son: *Técnicas* (agendas, libros, folletos, revistas, memorias, desplegables y publicaciones); *Divulgativas* (folletos y desplegables para pro-

ductores); e *Informativas* (folletos, boletines, desplegables, libros y publicaciones especiales). Además, se preparan artículos para otro tipo de publicaciones (revistas, libros, folletos y memorias).

El objetivo de la colección divulgativa es proporcionar a los productores y a otras personas relacionadas con el proceso productivo (extensionistas o agentes de cambio) información de carácter práctico y aplicable a los sistemas de producción agropecuarios y forestales, así como para el manejo del producto. La información proviene de los resultados de las investigaciones realizadas y validadas por el personal del CECAL. Esta colección esta formada por dos series: Folletos y Desplegables para Productores (MÉXICO, 1994b).

Sin embargo, actualmente no se tiene conocimiento sobre cuál y cómo ha sido la información publicada específicamente dentro de la colección divulgativa, que esta destinada principalmente a los productores agropecuarios del estado de Zacatecas, y a los agentes de cambio, que prestan asistencia técnica en el medio rural del mismo Estado.

De acuerdo a lo anterior, durante el primer semestre de 1995 se realizó un estudio sobre la colección divulgativa, con los objetivos de:

a) Conocer qué información se ha publicado dentro de las series Folletos y Desplegables para Productores.

b) Determinar la legibilidad y comprensión de éstas series, así como algunas de sus características morfológicas.

c) Proponer recomendaciones prácticas para la publicación de estas series dirigidas a productores agropecuarios y extensionistas.

La comunicación

La comunicación se entiende como una forma de interacción humana hecha a través de signos (MÉNDEZ,1983), y puede ser masiva, por grupos, e interpersonal; la primera de éstas contempla el uso de medios impresos (periódicos, revistas, libros, folletos, carteles, etc.) y electrónicos (programas de radio y audiovisuales, entre otros). Las características de la comunicación masiva, son: a) se dirige a auditorios relativamente grandes, heterogéneos y anónimos; b) los mensajes se transmiten en forma pública; y c) el comunicador suele pertenecer a organizaciones complejas (BLAKE and HAROLDSEN, 1975). Los medios masivos son más importantes en el período de primer conocimiento e interés dentro del proceso de adopción de innovaciones (ROGERS, 1964). Los factores que afectan la comunicación escrita por parte de la fuente son: a) su habilidad para escribir; b) su actitud respecto a la forma en que se dirige el mensaje; c) su actitud respecto al tema o asunto del mensaje; d) su conocimiento del receptor; y e) el contacto socio-cultural en el que opera la fuente.

Legibilidad

Se entiende como legibilidad a la facilidad de lectura de un texto escrito. Diferentes autores afirman que las oraciones que son largas y densas, son más difíciles de leer que aquellas cortas que contienen palabras breves (COLOMB and JOSEPH, 1985; WILSON y GALLUP, 1964; y MÉNDEZ, 1981). Para medir la legibilidad se han empleado diferentes métodos, entre los que destacan el de Spaulding y el de Cloze (VILLA, 1973 y WILCHES, 1976). Recientemente, Medardo Méndes Alfaro adaptó la fórmula de R. Flesch de su versión italiana al idioma español; para tal fin, estableció fundamental-

mente la diferencia en el número de palabras y de sílabas entre el español y el italiano; la fórmula incluye tres variables: *número de palabras, número de sílabas* y *número de oraciones* (MÉNDEZ, 1981).

Por lo que respecta a estudios sobre legibilidad, en 1967 en Colombia se realizó una investigación para medir la legibilidad de las cartillas publicadas por Acción Cultural Popular, y se encontró que las cartillas estudiadas fueron calificadas como moderadamente difíciles y los libros como difíciles, es decir, que el material no era apropiado para la población rural (QUIROZ, 1989). Por otra parte, al realizarse una prueba de legibilidad sobre la Sección Agropecuaria del periódico Momento, de la ciudad de Zacatecas, México, se encontró que la información había sido escrita en prosa normal, comprensible para cualquier lector que cursó más del tercer año de educación primaria (GALINDO, 1993).

Comprensión

La comprensión se refiere a la justa elección de las palabras, y corresponde a la interpretación correcta de los mensajes; en general, ésta es más compleja que la legibilidad. Un tema difícil puede ser perfectamente legible, desde el punto de vista gramatical y lingüístico, pero no comprensible para quien no maneja una determinada disciplina. Por lo anterior, puede darse la legibilidad, sin que necesariamente se comprenda el mensaje; la comprensión al contrario, no se puede dar si antes no se supera la etapa de la legibilidad (LOZA, 1985; GOUVEIA, 1980).

Se afirma también, que el uso de expresiones y palabras de uso general es un medio para asegurar la comprensión amplia de los mensajes dirigidos a las masas (HERMESDORF, 1981). Finalmente, se ha determinado que la comprensión está asociada con la escolaridad, el conocimiento previo que tiene el receptor sobre las palabras, lectura de medios de comunicación, uso de tecnología agrícola y edad (PÉREZ, 1987; LOZA, 1985; RÍOS, 1986).

Las publicaciones en el medio rural

El uso de las publicaciones como medio para transferir tecnología al medio rural es importante, ya que éstas presentan las siguientes ventajas: a) en general, los productores tienen confianza en la letra impresa; b) el material escrito puede leerse y estudiarse con calma y conservarse para futuras consultas; c) es un complemento necesario de otros medios; d) su costo de producción por unidad es relativamente bajo; y e) la información que proporcionan suele ser concreta (WILSON y GALLUP, 1964; FRÍAS, RAMSAY y BELTRÁN, 1966). Diferentes estudios realizados en México y América Latina, revelan que las publicaciones constituye, uno de los medios que prefieren los productores agropecuarios y los extensionistas para recibir información (GAYTAN, 1970; LOAIZA, 1988; GALINDO 1992a; GALINDO, 1992b).

Materiales y método

Legibilidad

Para medir la legibilidad de cada una de las series se aplicó la fórmula de R. Flesch, adaptada al español (MÉNDEZ, 1981), y cuya fórmula es:

$$IL = 206{,}59 - (0{,}610)(NS) - \frac{(0{,}95)\,(NP)}{NO}$$

donde:

IL= Índice de legibilidad

NS= Número de sílabas

NP= Número de palabras

NO= Número de oraciones

Para aplicar la fórmula anterior, en cada uno de los folletos y desplegables fue necesario contar el número de párrafos (que se determinó cuando finalizó en punto y aparte, punto y seguido, así como en punto y coma) compuestos aproximadamente entre 95 y 105 palabras; posteriormente, en forma aleatoria se seleccionó el 10% de los párrafos para cada publicación.

En el segundo nivel de medición, el número de palabras que integran cada uno de los párrafos seleccionados se multiplicó por 0,95, y el resultado se dividió entre el número de oraciones contenidas en el texto; posteriormente, se contó el número de sílabas que formaron el párrafo, y esta cifra se multiplicó por 0,610. Finalmente, los dos valores (el de sílabas y el de palabras) se restaron al valor fijo 206,59. Para cada folleto se calculó una media aritmética, de los diferentes párrafos analizados, y se definió su índice de legibilidad.

El resultado obtenido en cada una de las publicaciones analizadas se confrontó con el Cuadro 1, y en esta forma se conoció el grado de legibilidad alcanzado.

Comprensión

Por lo que respecta a la comprensión, se empleó el método propuesto por Hermesdorf (HERMESDORF, 1981), el cual consiste en lo siguiente:

a) Si se trató de un folleto con más de 10 páginas de texto, se tomó una muestra de 100 palabras de texto corrido por cada decena de páginas; la página o páginas donde se analizaron los textos fueron seleccionadas en base a números aleatorios, para que todas tuvieran la misma probabilidad de ser seleccionadas. Si fueron varios los textos analizados dentro de una publicación, se calculó la media aritmética al porcentaje determinado. Si la publicación tenía 10 o menos páginas, se tomó una muestra de una página entera del texto corrido, la cual fue seleccionada también en forma aleatoria. Si se trataba de desplegables, la muestra cubrió el total de la publicación.

CUADRO 1
RELACIÓN ENTRE EL GRADO Y LOS INTERVALOS DE LEGIBILIDAD, 1995.

Grado	Intervalo	Legibilidad
Baja	0 - 50	Prosa sumamente difícil
	51 - 60	Prosa difícil
Media	61 - 70	Prosa normal
	71 - 80	Prosa fácil
Alta	81 - 90	Prosa suficientemente fácil
	91 - 100	Prosa sumamente fácil

b) Las palabras de cada una de las muestras seleccionadas se buscaron en el Vocabulario Básico recopilado por Hermesdorf (HERMESDORF, 1981). El número de palabras de las muestras se relacionaron con el número de palabras no encontradas en el Vocabulario, y así se encontró el porcentaje de palabras de difícil comprensión.

c) Si el porcentaje indicado fue inferior al 10% se consideró que la comprensión del texto era fácil, es decir, que éste es adecuado para todos los niveles de lectores, y por supuesto para todos los agricultores y otros receptores con limitada capacidad de lectura. Si el porcentaje resultó de 10 a 20%, el grado de dificultad aumentó y la comprensión se consideró como mediana; si se encontraron más de 20% la dificultad se consideró como alta, lo cual indica que el texto no es adecuado para todos los receptores.

Aspectos formales

Para analizar los aspectos formales del texto se tomaron en consideración los siguientes indicadores: a) número de páginas por publicación; b) apoyos visuales en la portada (foto, figura, contraste de tintas y viñetas); c) tamaño y forma de la publicación; d) tipo de papel de la portada; e) tipo de papel de los interiores; f) color de los interiores; g) ancho de columna; h) tipo y tamaño de letras interiores; i) apoyos visuales de los interiores; y j) tablas o cuadros.

Resultados y discusión

Información publicada

Del mes de enero de 1974 al mes de abril de 1995 se publicaron un total de 42 Folletos para Productores y 20 Desplegables. Del total de publicaciones, el 20,9% se imprimió entre 1974 y 1978, el 24,2% de 1979 a 1985, el 22,6 de 1986 a 1989 y finalmente, el 32,3% se publicó de 1990 a 1995. El promedio de publicaciones impresas por año fue de 2.9.

En el Cuadro 2, se observa que las publicaciones impresas trataron los paquetes tecnológicos de los cultivos de frijol, maíz, cereales, frutales, pastos, hortalizas y sorgo; el tiraje aproximado de éstas fue de 62000. Es importante destacar, que el tiraje de algunas fue de 250 ejemplares y de otras se imprimieron 3000. Además no se publicó información sobre vid, a pesar de que se han realizado más de 10 años de investigación sobre este cultivo.

Legibilidad

En el Cuadro 3 se muestra que el 21,4% de los folletos presentaron un nivel de legibilidad de "Prosa sumamente difícil", ya que se ubicaron en el intervalo entre 0 y 50, según se aprecia en el Cuadro 1; lo anterior fue debido a que las oraciones analizadas presentaron un número mayor de 30 palabras por oración. Es importante destacar, que estas publicaciones de acuerdo a su legibilidad pueden ser adecuadas para receptores que tengan estudios medios y/o superiores (secundaria, bachillerato y/o licenciatura), pero no para receptores que no terminaron su educación básica.

Sin embargo, el 78,6% de los folletos estudiados indicaron estar redactados en "Prosa normal", "Fácil" y "Sumamente fácil", apto para lectores con bajo grado de escolaridad, lo cual representa el 77,8% de los productores agropecuarios del estado de Zacatecas (GALINDO, 1994).

CUADRO 2
TEMAS QUE TRATARON LOS FOLLETOS Y DESPLEGABLES IMPRESOS EN EL CECAL, 1995.

Tema	Número de folletos o desplegables	%
Folletos para Productores		
Frutales(d)	9	14,5
Maíz	9	14,5
Frijol	8	12,9
Cereales(a)	7	11,3
Pastos(b)	6	9,7
Hortalizas(c)	2	3,2
Sorgo	1	1,6
Desplegables para Productores		
Cereales(a)	7	11,3
Frijol	4	6,5
Maíz	4	6,5
Frutales(d)	3	4,8
Hortalizas(c)	2	3,2
Totales:	62	100

a) Se incluyó información sobre trigo, cebada y avena.
b) Se incluyó información sobre forrajes de corte y pastoreo directo.
c) Se incluyó información sobre chile, papa y ajo.
d) Se incluyó información sobre ciruelo, manzano, duraznero y nopal.

Por lo que respecta a las desplegables, el 70,0% presentaron "Baja legibilidad", ya que al aplicar la fórmula de R. Flesch su resultado mostró tener una prosa "Suma - mente difícil" y "Dicífil".

Comprensión

En el Cuadro 4 se observa que solamente nueve folletos y dos desplegables mostraron fácil comprensión y son adecuados para lectores que han cursado al menos el segundo año de educación primaria, o que fueron alfabetizados de otra manera, y cuyos conocimientos les son de utilidad para recibir información escrita. El mayor porcentaje de éstas series presentaron una comprensión mediana, lo cual muestra que el vocabulario usado en las publicaciones no resulta ser totalmente adecuado para un alto porcentaje de los productores, pero sí lo es para los agentes de cambio, que prestan asistencia técnica a éstos, y que su escolaridad mínima es de estudios de secundaria o bachillerato (GALINDO, 1992b).

De acuerdo a los resultados anteriores, es importante que se definan dos tipos de publicaciones: una para los productores de

campo, y la otra para los agentes de cambio. Los Folletos y Desplegables para Productores deben estar redactados en "Prosa fácil", y se debe tomar en consideración que actualmente los agricultores siguen presentando un bajo grado de escolaridad, y requieren textos a nivel elemental (con un número de palabras por oración que oscile entre 5 y 19). Por lo que respecta a las publicaciones destinadas a los agentes de cambio, éstas deben quedar redactadas en "Prosa normal", ya que un alto porcentaje tienen educación media; además, el número de palabras por oración debe estar entre 20 y 24.

Por lo que respecta a la comprensión, los Folletos y Desplegables para Productores deben presentar un vocabulario con palabras y expresiones de uso general, para lograr una comprensión más amplia y segura. En el caso de las publicaciones para agentes de cambio se podrá emplear un lenguaje técnico.

Aspectos formales

Folletos para productores

Los Folletos para Productores presentaron en su formato una base de 13,5 cm y una altura de 20,5 cm (con excepción de un ejemplar que midió 27,0 cm x 20,5 cm). En esta serie la mayoría de los forros fue de cartulina Couché de 119,5 kg/Rs; los interiores de papel Bond blanco o Couché de 37,0 Kg/Rs. Solamente se manejó una columna; la tipografía fue realizada en letra tipo Helvética y Universe, de 10 y 12 puntos. La encuadernación se realizó a "caballo".

En esta serie, el promedio de páginas de las publicaciones fue de 16; además, 21 presentaron apoyos visuales (fotografías) en sus portadas, y nueve en sus interiores (éstas fueron con mayor frecuencia en blanco y negro); además, en las portadas se usó el contraste de tintas y se emplearon viñetas, cuando no se imprimieron fotografías. En

CUADRO 3
LEGIBILIDAD DE LOS FOLLETOS Y DESPLEGABLES IMPRESOS EN EL CECAL. 1995

Legibilidad	Número de folletos	%	Número de desplegables	%
Prosa sumamente difícil	9	21,4	12	60,0
Prosa difícil	0	0,0	2	10,0
Prosa normal	25	59,5	5	25,0
Prosa fácil	6	14,3	1	5,0
Prosa suficientemente fácil	0	0	0	0
Prosa sumamente fácil	2	4,8	0	0
Totales:	42	100	20	100

CUADRO 4
COMPRENSIÓN DE LOS FOLLETOS Y DESPLEGABLES IMPRESOS EN EL CECAL, 1995.

Comprensión	Número de folletos	%	Número de desplegables	%
Fácil	9	21,4	2	10,0
Mediana	31	73,8	17	85,0
Alta	2	4,8	1	5,0
Totales:	42	100	20	100

lo que se refiere al uso de cuadros y figuras en los interiores, este fue mínimo. La impresión de los interiores se realizó en color negro.

Desplegables para productores

Los desplegables presentaron una base de 34,5 cm y una altura de 22,0 cm. La base se presentó doblada en tres partes iguales (en forma de tríptico). El papel en el cual se imprimieron fue Bond y Couché de 37,0 Kg/Rs. Solamente un desplegable contó con apoyos visuales (fotografías) y el uso de cuadros fue más notable en esta serie. La información fue presentada en una columna con letras Helvética o Universe de 10 a 12 puntos. Lo anterior muestra que esta colección fue publicada en forma homogénea, y con una presentación adecuada.

Comentarios generales sobre las publicaciones

Al revisar las publicaciones estudiadas se pudo observar lo siguiente: a) contienen información útil generada por los investigadores del Campo Experimental Calera; b) se hace uso correcto de las reglas gramaticales, ya que éstas fueron revisadas por un Comité Editorial y quedaron a cargo de un editor; c) la información transmitida fue breve y exacta; d) se evitó el uso de abreviaturas; y e) los apoyos visuales utilizados fueron de buena calidad. Además, todas quedaron registradas con un número de serie, la fecha de impresión y su tiraje.

Conclusiones

– En el CECAL se publicaron un total de 42 Folletos para Productores y 20 Desplegables; la mayoría fueron impresos entre 1986 y 1995. Estas series trataron temas relacionados con los cultivos de frutales, maíz, frijol, cereales, pastos, hortalizas y sorgo.

– La mayoría de los folletos fueron redactados en "Prosa normal", "Fácil" y "Sumamente fácil", adecuados para productores con bajo nivel de escolaridad. Por otra parte, el mayor porcentaje de los desplegables resultaron con una "Prosa sumamente difícil" y "Difícil", no apto para productores, pero sí para los agentes de cambio.

– Solamente nueve folletos y dos desplegables mostraron "Fácil comprensión", y el

mayor porcentaje se ubicó en "Mediana", no adecuada para los lectores que han cursado el primero o segundo año de educación primaria, característica que prevalece en el medio rural zacatecano.

– La calidad de la presentación física de estas publicaciones es buena y muestra uniformidad.

Bibliografía

BLAKE, R. H., and HAROLDSEN, O. E. 1975. *A taxonomy of concepts in communication.* Copyright, by Hastings Hastings House, Publishers, In. New York. pp. 38-41.

COLOMB, G.G., and JOSEPH, M. W. 1985. *Perceiving structure in professional prose: a multiply determined experience.* En: Writing in Nom-Academic Setting. Guil Ford Press. pp. 87-128.

FRÍAS, M. H., RAMSAY, A. J., y BELTRÁN, R. L. 1966. *Extensión agrícola: principios y técnicas.* Perú, Instituto de Ciencias Agrícolas de la OEA. pp. 233-234.

GAYTÁN, E. F. 1970. *Identificación de los principales problemas, líderes y medios de información actuales y preferidos del ganadero del estado de Nuevo León.* México. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. p. 54.

GOUVEIA, P. J. 1980. *Algunos factores que influyen en la comprensión de mensajes dirigidos a los agentes de cambio.* México. Tesis de M. C. Colegio de Postgraduados. pp. 49-53.

GALINDO, G. G. 1992a. Asistencia técnica a productores rurales del estado de Tabasco. *Ciencia* (México). 43: 381-390.

GALINDO, G. G. 1992b. Diagnóstico de la extensión agropecuaria en Zacatecas. *Fitotecnia* (México). 15(2):169-184.

GALINDO, G. G. 1993. Contenido y legibilidad de la "sección agropecuaria" del periódico Momento de Zacatecas. *Fitotecnia.* (México). 16(1): 21-29.

GALINDO, G. G. 1994. *Uso de tecnología agropecuaria en la región central de Zacatecas.* México, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. p. 27.

HERMESDORF, R. 1981. *Vocabulario básico.* México, Colegio de Postgraduados. 183. p.

LOZA, V. E. 1985. *Efectividad de un folleto editado por el INIA para difundir técnicas mejoradas sobre el cultivo de maíz en una región de Puebla.* México. Tesis de M.C. Colegio de Postgraduados. p. 140.

LOAIZA, C. A. 1988. *Efectividad de algunos medios de comunicación en la transferencia de tecnología a la mujer rural.* Colombia, Ministerio de Agricultura, Instituto Colombiano Agropecuario (Boletín de Investigación No 73). p. 27.

MÉNDEZ A. M. 1981. *Medición de la legibilidad de textos agrícolas a través de la fórmula de R. Flesch.* Agricultura Técnica en México (México). 7(2): 127-147.

MÉNDEZ, A. M. 1983. *Comunicación agrícola escrita.* México, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. p. 13.

MÉXICO, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. 1994a. *Guía para la elaboración de proyectos de investigación.* Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. pp. 1-3.

MÉXICO, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. 1994b. *Normas para la producción de las publicaciones del INIFAP.* Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. p. 7.

PÉREZ, L. E. 1987. *Comprensión de palabras técnicas por ejidatarios del municipio de Cotaxtla, Veracruz.* México, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (Folleto de Investigación No 69). p. 80.

QUIROZ, D. E. 1989. *Guía para la selección y producción de medios para la transferencia de tecnología agropecuaria.* Colombia, Ministerio de Agricultura, Instituto Colombiano Agropecuario. p. 18.

ROGERS, M. 1964. *Estudio comparativo del proceso de innovación: fuentes de información en el proceso de adopción del herbicida 2,4-D en tres comunidades rurales colombianas.* In: Myren, D. T: ed. "Primer simposium interamericano de las funciones de la divulgación en el desarrollo agrícola. México,

Secretaría de Agricultura y Ganadería, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. 81 p.

RÍOS, R. S. 1986. *Legibilidad, comprensión y uso de tecnología por agricultores de dos comunidades del estado de Veracruz.* México, Tesis de M. C. Colegio de Postgraduados. p. 241.

VILLA, V. J. 1973. *Prueba de lecturabilidad de la página agrícola de "El Dictamen" de Veracruz.* Agricultura Técnica en México. (México). 3(7): 271-276.

WILSON, C. M. y GALLUP, G. 1964. *Métodos de enseñanza en extensión y otros factores que influyen en la adopción de prácticas agrícolas y de economía del hogar.* México, Centro Regional de Ayuda Técnica. p. 72.

WILCHES, R. H. 1976. *Lecturabilidad de textos, medida por el procedimiento Cloze, de las circulares DAGEM denominadas desplegables; estudio realizado con productores agrícolas y pecuarios del estado de México.* México. Tesis de M.C. Colegio de Postgraduados. pp. 158-159

(Aceptado para publicación el 21 de mayo de 1996)

ITEA (1996). **Vol. 92A N.º 2,** 126-133

RESPUESTA DE FORRAJE Y GRANO A LA DENSIDAD DE PLANTAS EN MAÍCES CON HOJAS EXTENDIDAS Y ERECTAS

G. Núñez Hernández[1]
F. González Castañeda[2]
S. Martín Del Campo Valle[2]
J.J. Márquez Ortiz[1]

1. Investigador en forrajes
Campo Experimental La Laguna, INIFAP
Apdo. postal 247
27000 Torreón, Coah.
México

2. Investigador en maíz
Campo Experimental Pabellón, INIFAP
Apdo. postal 20
20600 Pabellón de Arteaga, Ags.
México

RESUMEN

La respuesta a la densidad de plantas entre genotipos de maíz puede ser diferente. Dos experimentos se realizaron en el Campo Experimental Pabellón ubicado en el área templada de México. El objetivo fue evaluar la respuesta en producción de grano y forraje de dos genotipos diferentes de maíz a la densidad de plantas. El híbrido HV-313 (hojas erectas) y la variedad Celaya (hojas extendidas) se evaluaron a densidades de 40, 65, 90 y 115 mil plantas/ha. Los experimentos se establecieron en forma independiente por genotipo bajo el diseño de bloque completos al azar. La densidad de plantas tuvo un efecto lineal en la producción de forraje en verde y seco del HV-313 ($P<0.05$), pero no afectó la producción de grano ($P>0.05$), a pesar que disminuyó el número de mazorcas por planta ($P<0.01$). En la variedad Celaya, el número de mazorcas por planta disminuyó ($P<0.01$), pero no afectó el rendimiento de grano o forraje ($P>0.05$). Este trabajo sugiere que los híbridos de maíz con hojas erectas tienen buen potencial para aumentar la produción de forraje en cantidad y calidad mediante el incremento de la densidad de plantas.

Palabras clave: Maíz, densidad de plantas, forraje, grano, genotipos.

SUMMARY
PLANT DENSITY ON FORAGE AND GRAIN YIELD OF MAIZE WITH LAX OR ERECT LEAVES

Two experiments were established at the Pabellon experimental Station, Ags. Mex., located in the temperate region in México. The objective was to evaluate forage and grain responses of two different maize genotypes to plant density. The hybrid HV-313 (erect leaf hybrid) and the variety Celaya (lax leaves) were evaluated at population

densities of 40, 65, 90 and 115 thousand plants per hectare. These experiments were established independently by genotype, both under a randomized complete block design. Plant density had a linear effect on green and dry forage ($P<0.05$), but did not affect grain yield ($P>0.05$), even as the number of ears per plant decreased ($P<0.01$). The variety Celaya had a reduction in number of ears per plant ($P<0.01$) as plant density increased, but neither grain yield nor forage production decreased with increasing plant population density ($P>0.05$). This research suggests that maize hybrids with erect leaves have a good potential to increase the amount and quality of forage production by increasing plant density.

Key words: Maize, plant density, forage, grain, genotypes.

Introducción

El objeto de la producción de forrajes es obtener la mayor cantidad y calidad nutritiva de materia seca por unidad de área. Esto hace necesario considerar la influencia de factores genéticos y ambientales en el cultivo. En México, las variedades de maíz para forraje provienen de programas de mejoramiento genético para producción de grano. Se ha señalado una relación directa entre potencial para grano y materia seca (PATEL y SHELKE, 1988). Por esta razón, muchas variedades de maíz para grano se han utilizado para producir forraje. Sin embargo, SAMPOUX *et al.* (1989) encontraron que la selección específica para producción de forraje es 35% más efectiva, en comparación a la selección para producción de grano.

Las prácticas agronómicas más comunes para aumentar la producción de grano y materia seca son la densidad y el arreglo topológico de las plantas en el campo, ya que aumentan la intercepción de la radiación solar. El incremento en la densidad de plantas disminuyó la producción de materia seca y grano por planta, el número de mazorcas y el índice de área foliar, pero el rendimiento total de materia seca y grano aumentó hasta en densidades de 90 mil plantas/ha (BANGARWA *et al.*, 1988). PINTER *et al.* (1994) indicaron que la densidad de plantas para obtener la mayor producción de forraje es mayor que para producción de grano, pero la diferencia es variable entre híbridos.

Recientemente, en México se han liberado híbridos de hojas erectas resultado de cruzamientos de germoplasma enano braquítico-2 con germoplasma normal. El estudio de estos híbridos se ha enfocado a la producción de grano, pero se desconoce su potencial de producción para forraje. El objetivo de este trabajo fue determinar la respuesta a la densidad de plantas de genotipos de maíz de hojas erectas y extendidas en base a su producción de forraje y grano.

Materiales y métodos

Dos experimentos se realizaron en el Campo Experimental Pabellón, Ags., que tiene características ecológicas representativas del área templada de México. Este lugar se localiza a 22o 11' lat. norte, 102° 20' longitud oeste y tiene una altitud de 1912 msnm. El clima es templado con una temperatura promedio anual de 16.7 °C y una precipitación pluvial de 544 mm durante los

meses de Junio a Septiembre. Los suelos son de textura migajón areno-arcilloso y pH ligeramente alcalino. La densidad aparente es de 1.45 y el contenido de materia organica de 1.5%.

El híbrido intravarietal HV-313 es el resultado de cruzas de germoplasma con el gene braquitico-2 y germoplasma tropical de México, con un ciclo de 136 días a la madurez fisiológica. La variedad Celaya es una variedad de hojas extendidas derivado de un compuesto de la región central de México con un ciclo de 144 días a la madurez fisiológica.

La siembra se realizó en forma manual el 2 de mayo de 1990 en suelo húmedo. Se utilizaron cadenas para depositar granos en exceso para asegurar 40, 65, 90 y 115 mil plantas/ha. Posteriormente, se realizó un aclareo en el momento de la aparición de la quinta hoja, para dejar las densidades de plantas programadas. La fertilización fue 120-60-00 (N-P-K) en la siembra. La única escarda se realizó el 31 de mayo y se aplicaron dos riegos de auxilio durante el ciclo. Debido a la presencia de lluvias (369 mm) la humedad del suelo se mantuvo a nivel adecuado durante el transcurso de los experimentos.

Los experimentos se establecieron en forma independiente para cada genotipo, cada uno bajo diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. La separación de los genotipos por experimento se debió a las diferencias fisiológicas entre ellos. Por lo tanto, se enfatizó el análisis de la respuesta de cada genotipo a la densidad de plantas. Las parcelas experimentales consistieron de 8 surcos de 10 m de largo espaciados a 76 cm. La producción de forraje se determinó en estado lechoso-pastoso en los surcos 2 y 3. El contenido de materia seca del forraje a 60 °C, se obtuvo de una muestra de cuatro plantas por parcela. La producción de grano se determinó en los surcos 5 y 6. El surco 4 se utilizó para mantener la competencia hasta la madurez fisiológica del grano en las parcelas para evaluar grano. La cosecha de grano se realizó cuando se observó la aparición de la capa negra en el grano. Los días al 50% de floración masculina y 50% de floración femenina se determinaron mediante conteos de diez plantas al azar en cada parcela. Los índices de área foliar (IAF) se determinaron en cuatro plantas desde el día 35 después de la siembra hasta la madurez fisiológica, en intervalos de 15 días. El índice de área foliar se estimó mediante el procedimiento propuesto por FRANCIS *et al.* (1969).

Los experimentos fueron analizados mediante un modelo estadístico que incluyó la descomposición ortogonal de la suma de cuadrados de los tratamientos. Con esto se evaluaron los efectos lineales, cuadráticos y cúbicos en producción de forraje verde y seco, número de mazorcas, días a la floración masculina y floración femenina, altura de planta y rendimiento de grano. Los procedimientos se realizaron de acuerdo con STEEL y TORRIE (1980) utilizando PROC GLM (SAS, 1985).

Resultados y discusión

La producción de forraje en verde y seco por hectárea del híbrido HV-313 aumentó en forma lineal ($P<0.05$) con la densidad de plantas (Cuadro 1). La densidad de plantas no afectó ($P>0.05$) el rendimiento de grano, a pesar de la reducción en el número de mazorcas por plantas ($P<0.01$). En la variedad Celaya, el aumento en la densidad de plantas no incrementó la producción de forraje verde, seco ni de grano por hectárea

CUADRO 1
PRODUCCION DE FORRAJE DEL HIBRIDO DE MAIZ HV-313 BAJO DIFERENTES DENSIDADES DE PLANTAS EN LA REGION TEMPLADA DE MEXICO

	Densidad de plantas (miles plantas/ha)				Error estándar	Contrastes		
	40	65	90	115		Lineal	Cuadrático	Cúbico
Materia verde (ton/ha)	53.6	56.2	58.4	64.5	2.54	**	NS	NS
Materia seca (ton/ha)	14.7	14.8	16.4	18.7	1.40	*	NS	NS
Grano (ton/ha)	8.4	9.3	9.4	9.2	0.28	NS	NS	NS
Mazorcas por planta	1.3	1.1	1.0	0.9	0.04	**	NS	NS
Altura de planta (m)	1.8	1.9	2.0	2.0	0.04	**	NS	NS
Días a floración masculina	4.2	85.0	86.0	86.7	0.44	**	NS	NS
Días a floración femenina	85.5	86.2	88.0	89.0	0.51	**	NS	NS

* P<0.05
** P<0.01
NS No significativo (P>0.05)

(P>0.05), a pesar de que disminuyó el número de mazorcas por planta como en el HV-313 (Cuadro 2).

La altura del HV-313 se incrementó con la densidad de plantas (P<0.01) mientras que en la variedad Celaya se observó un efectó cúbico (P<0.05); sin embargo, ninguna de las variedades presentó problemas de acamado (Cuadros 1 y 2).

Los días a las floraciones masculina y femenina en el HV-313, se incrementaron con la densidad de plantas en forma similar (P<0.05), razón por la que no existió asincronía entre ellas, pero aumentó la duración del ciclo del híbrido. En la variedad Celaya, los días a la floración masculina no fueron afectados por la densidad de plantas (P>0.05), pero los días a la floración femenina se incrementaron en forma lineal (P<0.05), lo que ocasionó asincronía entre los dos tipos de floraciones a medida que se incrementó la densidad de plantas. El índice de área foliar en los dos genotipos y en todas las densidades de plantas tuvo el mismo patrón de desarrollo. Los valores máximos de IAF fueron de 9 a 10 entre 80 a 95 días después de la siembra en los dos genotipos (Figura 1 y 2).

La respuesta positiva del rendimiento de forraje del híbrido HV-313 al incrementar la densidad coincide con lo hallado por otros autores, así JOLLIFE *et al.* (1990) encontraron que el rendimiento de forraje se incrementó al pasar de 49 a 111 mil plantas por hectárea. GRAYBILL *et al.* (1991) también obtuvieron respuestas positivas en producción de materia seca con 15.7, 16.5 y 17.5 ton/ha para densidades de 50, 65 y 80 mil plantas/ha. El estudio de un rango amplio de densidades de plantas generó una relación asintótica entre producción de forraje y densidad de plantas. En dicho estudio, la mayor

CUADRO 2
PRODUCCION DE FORRAJE DE LA VARIEDAD DE MAIZ CELAYA BAJO DIFERENTES DENSIDADES DE PLANTAS EN LA REGION TEMPLADA DE MEXICO

	Densidad de plantas (miles plantas/ha)				Error estándar	Contrastes		
	40	65	90	115		Lineal	Cuadrático	Cúbico
Materia verde (ton/ha)	60.0	56.2	60.1	59.5	3.03	NS	NS	NS
Materia seca (ton/ha)	11.7	14.0	15.2	15.1	1.15	NS	NS	NS
Grano (ton/ha)	5.9	6.6	5.6	5.2	0.88	NS	NS	NS
Mazorcas por planta	1.1	0.8	0.6	0.6	0.08	**	NS	NS
Altura de planta (m)	2.8	3.0	2.5	2.7	0.93	NS	NS	*
Días a floración masculina	92.0	93.5	97.0	97.5	2.68	NS	NS	NS
Días a floración femenina	97.5	99.7	103.7	108.2	2.92	*	NS	NS

* P<0.05
** P<0.01
NS no significativo (P>0.05)

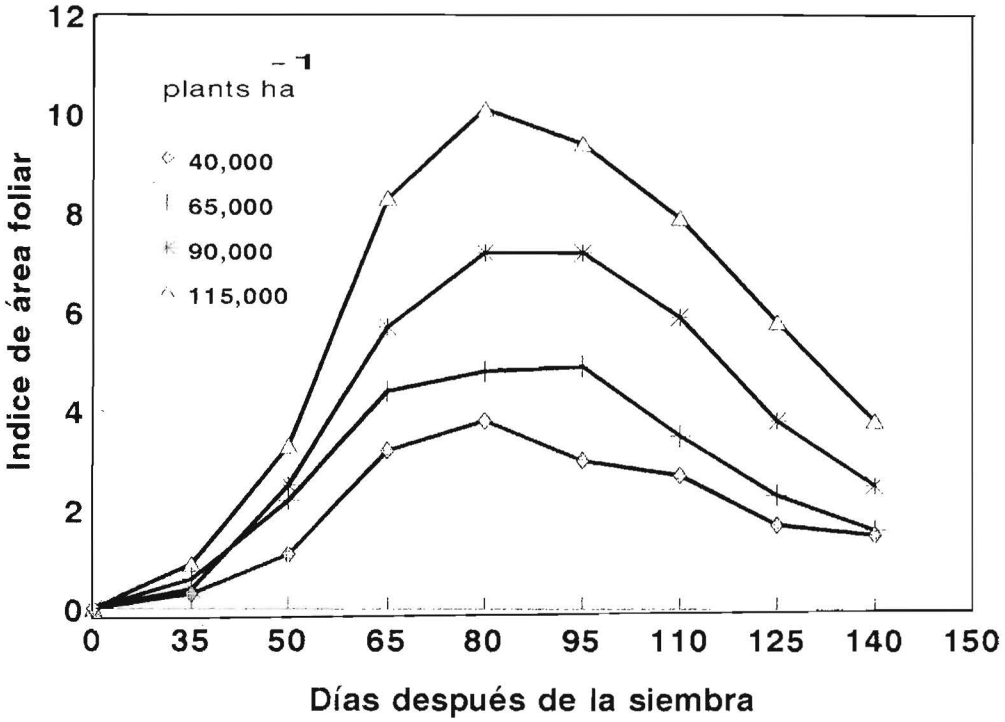


Figura 1. Índice de área foliar durante el desarrollo del híbrido de maíz HV-313 bajo cuatro densidades de plantas

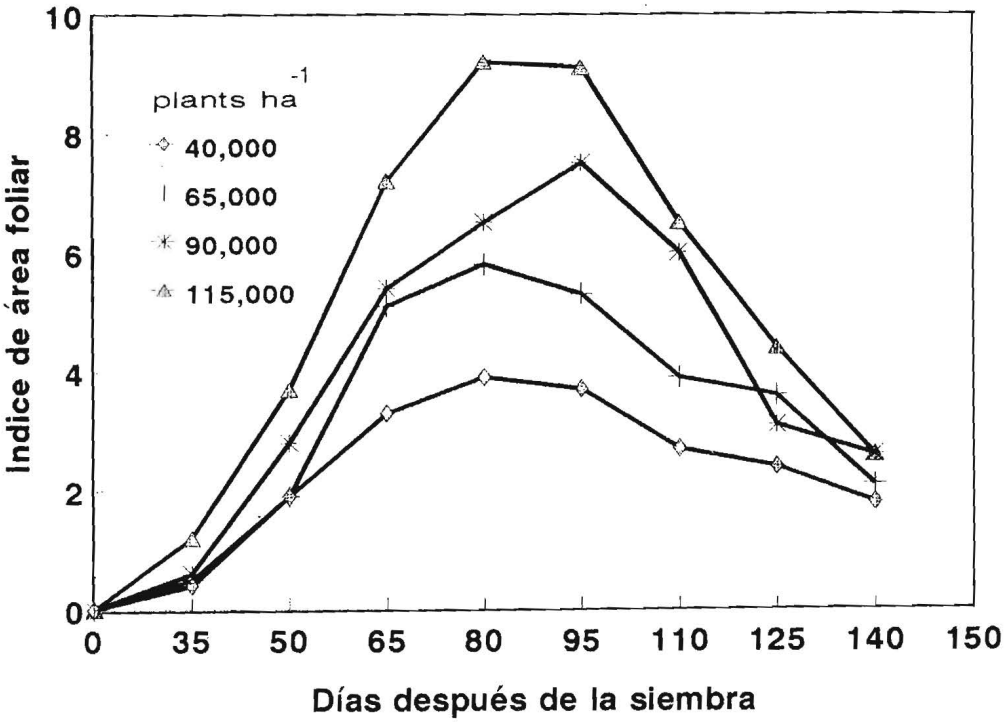


Figura 2. Índice de área foliar durante el desarrollo de la variedad de maíz Celaya bajo cuatro densidades de plantas

producción se obtuvo con una densidad de 125 mil plantas/ha (TETIO-KAGHO y GARDNER 1988). Nuestros resultados sugieren que la densidad crítica del HV-313 para obtener la mayor producción de forraje por hectárea es superior a las 115 mil plantas/ha, que fue la mayor densidad de plantas evaluada en este trabajo.

TETIO-HAGHO y GARNIER (1988) reportaron que un ajuste fisiológico en el maíz es la disminución en el número de mazorcas por planta al aumentar la densidad de plantas, como se observó en el presente estudio. Esto ocasiona un menor índice de cosecha por planta pero permite aumentar el rendimiento por hectárea hasta una densidad óptima (BERZSENYI, 1988). TETIO-KAGHO y GARDNER (1988) hallaron que esta relación entre la producción de grano y la densidad de plantas fue parabólica. La mayor producción de grano se obtuvo con una densidad de 100 mil plantas/ha. En nuestro trabajo, las diferencias de densidad de plantación no ocasionaron incrementos ni reducciones de rendimiento de grano en ninguno de los dos genotipos.

La mejor respuesta del HV-313 con índices de área foliar altos se considera una característica deseable para la producción de forraje. Nuestros resultados coincidieron en parte con GRAYBILL *et al.* (1991), quienes hallaron IAF óptimos para producción de grano de 3 a 3.2 e IAF críticos hasta de 6 para producción de forraje. Una de las posibles explicaciones de la respuesta positiva en producción de forraje del HV-313 bajo

altos IAF es la característica erecta de sus hojas. En experimentos con manipulación mecánica para inclinar las hojas se observó un incremento de 40% de grano en comparación con el mismo híbrido con hojas extendidas (PENDLETON *et al.*, 1968). Por otra parte, en genotipos con hojas verticales arriba de la mazorca y hojas horizontales abajo de la misma se ha tenido una mejor intercepción de la radiación solar en los diferentes estratos foliares (CASTILLO *et al.*, 1990).

Este trabajo mostró que no existió ninguna respuesta de la variedad Celaya a la densidad de plantas. CARLONE y RUSSEL (1987) indicaron que en los Estados Unidos de América, los incrementos más notables en el rendimiento de grano se observaron con híbridos para sustituir a las variedades de polinización libre. En ese estudio también se demostró que una de las características de esos híbridos fue su respuesta positiva a la densidad de plantas. PINTER *et al.* (1994) también demostraron que la respuesta a la densidad de plantas es diferente entre variedades de maíz. Los resultados de este trabajo sugieren que los nuevos híbridos de hojas erectas (HV-313) en México tienen una mejor respuesta al aumento de la densidad de plantas que las variedades viejas (Celaya).

Conclusiones

En el híbrido de hojas erectas HV-313 se obtuvo un incremento lineal en la producción de forraje al aumentar la densidad de plantas, pero no fue posible determinar la densidad crítica para obtener la máxima producción por hectárea. Sin embargo, no se obtuvo respuesta en rendimiento de grano. En la variedad Celaya de hojas extendidas no se observaron respuestas positivas ni negativas en producción de forraje ni en grano por hectárea. Dicha variedad fue más sensible a los efectos causados por el aumento en densidad de plantas, en el número de mazorcas por planta y en la sincronización entre floraciones masculina y femenina.

Bibliografía

BANGARWA, A.S., AIRON M.S., SING K.P., 1988. Effect of plant density and level and proportion of nitrogen fertilization on growth, yield and yield components of winter maize (*Zea mays* L.). Indian Journal of Agricultural Sciences, 58, 854-856.

BERZSENYI, Z., 1988. Changes in the harvest index of maize (*Zea mays* L.) in relation to fertilizer application, plant density and growing season. Novenytermeles, 37, 229-238.

CARLONE M.R., RUSSELL W.A., 1987. Response to plant and nitrogen levels for four maize cultivars from different eras of breeding. Crop Sci., 27, 465-470.

CASTILLO R.M.A., LIVERA M.M., GONZÁLEZ H.V.A., 1990. La arquitectura de la planta de maíz y la distribución de la radiación fotosinteticamente activa en la cubierta. Resumen. XIII Congreso Nacional de Fitogenética. Chih, Chih., pp. 122.

FRANCIS, C.A., RUTGER J.N., PALMERA.F.E., 1969. A rapid method for plant leaf area estimation in maize (*Zea mays* L.). Crop Sci., 9, 537-539.

GRAYBILL J.S., COX W.J., OTIS D.J., 1991. Yield and quality of forage maize as influenced by hybrid, planting date, and plant density. Agron. J., 83, 559-564.

JOLLIFE P.A., TARIMO, A.J.P., EATON G.W., 1990. Plant growth analysis: Growth and yield component responses to population density in forage maize. Annals of Botany, 65, 139-147.

PATEL M.P., SHELKE D.K., 1988. Correlation studies in forage maize. J. of Maharastra Agricultural Universities, 13, 218-219.

PENDLETON J.W., SMITH G.E., WINTER S.R., JOHNSTON T.J., 1968. Field invetsigations of the relationship

of leaf angle in corn (Zea mays L.) to grain yield and apparent photosyntesis. Agron. J., 60, 422-424.

PINTER L., ALFODIZ., BURUCS., PALDI E., 1994. Feed value of forage maize hybrids varing in tolerance to plant density. Agron. J., 86, 799-804.

SAMPOUX P., GALLAIS A., LFORT B.M., 1989. Selection combining fodder value and grain quality for fodder and grain maize breeding. Agronomie, 7, 667-675.

SAS INSTITUTE, 1985. SAS User's guide: statistics. SAS Inst., Cary, N.C.

STEEL R.D., TORRIE J.H., 1980. Principles and procedures of statistics. 2nd ed. McGraw-Hill. New York, 633 p.

TETIO-KAGHO F., GARDNER F.P., 1988. Responses of maize to plant population density. II. Reproductive development, yield and yield adjustments. Agron. J., 80, 935-940.

(Aceptado para publicación el 10 de junio de 1996)

ITEA (1996), Vol. **92A N.º 2,** 134-142

EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE SELENIO EN CORDEROS DE RAZA GALLEGA

M. I. Miranda Castañón
C. Castillo Rodríguez
G. Santamarina Pernas
M. López Alonso
J. Hernández Bermúdez
J.L. Benedito Castellote

Departamento de Patología Animal.
Facultad de Veterinaria de Lugo. 27002 Lugo.

RESUMEN

Se ha llevado a cabo un trabajo para evaluar las concentraciones de selenio en corderos de un rebaño raza Gallega. Para ello se determinaron las concentraciones de selenio sérico por espectofotometría de absorción atómica combinada con generación de hidruros y las enzimas glutatión-peroxidasa (GSH-Px), creatín-fosfoquinasa (CPK) y aspartato-aminotransferasa (ASAT) por técnicas enzimático-colorimétricas.

La concentración media de selenio sérico en el conjunto de los animales fue de 21,86±0,14 ppb, y las actividades medias de las enzimas fueron para la GSH-Px de 107,51±7,6 UI/g Hb, para la CPK de 85,56±9,8 UI/l y para la ASAT de 34,5±2,2 UI/l. Los corderos procedentes de gestación múltiple presentaron menor concentración de selenio sérico y mayor actividad de la enzima CPK que los de gestación sencilla. El sexo de los corderos no influye significativamente sobre los parámetros analizados.

Palabras clave: Corderos, Selenio, Glutatión-peroxidasa, Enzimas musculares.

SUMMARY
EVALUATION OF SELENIUM LEVELS IN GALICIAN OVINE BREED LAMBS

Selenium levels in Galician ovine breed lambs have been studied in one flock. To carry out our purpose the serum selenium concentration was analysed by atomic absorption spectrophotometry with hydride generation, and glutathione peroxydase (GSH-Px), creatine-fosfokinase (CPK) and aspartate-aminotransferase (ASAT) enzymes were analized using enzymatic-colorimetric techniques.

The mean serum selenium concentration was 21.86±0.14 ppb and the mean enzyme activity were 107.51±7.6 UI/g Hb of GSH-Px, 85.56±9.8 UI/l of CPK and 34.5±2.2 UI/l of ASAT. Twin lambs had less serum selenuim concentration and more CPK activity than single lambs. Sex didn't have any influence on these parameters.

Key words: Lambs, Selenium, Glutathione peroxidase, Muscle enzymes.

Introducción

La carencia de selenio en los animales produce diferentes alteraciones patológicas, de las cuales la más relevante es la Enfermedad del musculo blanco, proceso que afecta principalmente a corderos jóvenes de menos de seis semanas cuando proceden de madres que han recibido una dieta pobre en selenio durante la gestación (JIMÉNEZ y cols., 1991).

El selenio ejerce su papel biológico a través de la seleno-enzima glutatión-peroxidasa (GSH-Px) (ROTRUCK y cols., 1973), que cataliza las reacciones que ayudan a destruir al peróxido de hidrógeno y a los peróxidos de ácidos grasos, evitando así los daños derivados de ellos (RAMÓN-GIMÉNEZ, 1993).

Los dismetabolismos del selenio-GSH-Px desencadenan alteraciones en el mecanismo oxidativo, produciéndose por su deficiencia peroxidación lipídica de las fibras musculares, llegando finalmente a degeneración y necrosis. Como consecuencia de ello se liberan al torrente circulatorio determinados enzimas musculares (BLOOD y cols., 1992).

Son muy numerosos los factores etiológicos que actúan en el desencadenamiento de este proceso nutricional, factores que reducen la concentración de selenio en las plantas y factores que reducen la ingestión y/o aprovechamiento por parte de los animales. Las características climáticas y edafológicas de Galicia determinan suelos ácidos y con escasa aireación, junto con elevadas precipitaciones, lo que conlleva bajas concentraciones de selenio en los suelos, y por tanto en los pastos y en los animales (KOLLER, 1981).

La raza ovina Gallega define animales de pequeño tamaño, bien enlanados, generalmente de color blanco y dedicados a la producción cárnica. Están adaptados a una geografía y climatología difícil de soportar por otras razas más seleccionadas. Es característica de esta raza la alta fertilidad y prolificidad, con predisposición de partos gemelares y triples. La explotación de esta raza se realiza en régimen extensivo, con base de pastoreo, siendo su estructura reflejo del minifundismo agrario existente en la provincia de Lugo y en Galicia en general (SÁNCHEZ GARCÍA y cols., 1989).

El objetivo del presente trabajo se centra en la evaluación del selenio en corderos, desde el momento del nacimiento hasta el mes de edad; valorando, así mismo, la influencia del nacimiento de parto sencillo o múltiple y del sexo, en un modelo de explotación típica de Galicia. Para ello realizamos la determinación de los niveles séricos de selenio, por ser el parámetro más adecuado para detectar pequeñas variaciones en intervalos breves de tiempo (STOWE y HERDT, 1992). También se valoraron la actividad de la enzima GSH-Px, ya que nos da idea de la protección que presenta el animal frente a daños oxidativos, y las enzimas marcadoras de alteración muscular creatínfosfoquinasa (CPK/CK) y aspartato-aminotransferasa (ASAT/GOT).

Material y métodos

La toma de muestras se realizó en una explotación de ganado ovino de raza Gallega situada en la provincia de Lugo. Los animales eran explotados en régimen de semiestabulación, la base de la alimentación la constituía el pastoreo en praderas polifíticas naturales, recibiendo además una complementación de la ración con heno (primavera y verano) y ensilado (otoño), no teniendo suplementación mineral. El estado

general de los animales era satisfactorio, no presentando ninguna manifestación sintomatológica durante toda la experiencia.

Se seleccionaron 10 hembras de primer parto, que fueron sometidas a un proceso de sincronización de celo (Abril 1994), empleando acetato de fluorogestona (Cronolone®) (30mg/esponja intravaginal) y PMSG (300 UI), con el propósito de sincronizar los partos. Durante el 2° y 3° mes de preñez (Junio-Julio) se realizó el diagnóstico de gestación por ultrasonidos, apreciando a su vez las hembras que mantenían una gestación simple o múltiple.

En el mes de Septiembre tuvo lugar el parto de las hembras, con un total de 15 corderos, a los que se les tomaron muestras de sangre hasta el mes de edad (5 tomas), a intervalos de tiempo semanales, extrayendo paralelamente muestras a las madres. Del total de los corderos, 5 eran procedentes de parto sencillo y 10 de parto doble; 7 hembras y 8 machos. Se extrajeron 10 ml de sangre venosa de la yugular a cada animal, de los cuales 2,5 ml se depositaron en tubos con EDTA dipotásico para la determinación de la hemoglobina, 2,5 ml en tubos con heparina para la actividad glutatión-peroxidasa, y del resto se obtuvo suero para la cuantificación de los niveles de selenio sérico y las actividades enzimáticas creatín-fosfoquinasa y aspartato-aminotransferasa.

Los niveles séricos de selenio (ppb), se cuantificaron por espectofotometría de absorción atómica combinada con generación de hidruros. La actividad glutatión-peroxidasa (UI/g Hb) se determinó mediante el empleo del kit comercial (Ransel ® Randox. U.K.), basado en el método de Plagia y Valentine (1967), leyendo las absorbancias a 340 nm y a temperatura estable de 37°C en un espectofotómetro de luz UV/Vis. La hemoglobina se midió por el método de la cianmetahemoglobina (HAINLINE, 1958). La cuantificación de las enzimas creatín-fosfoquinasa y aspartato-aminotransferasa (UI/l) se determinó con kits (Knickerbocker), realizándose las lecturas de las absorbancias a 340 y 505 nm respectivamente, en el citado espectofotómetro.

El procesamiento estadístico de los datos se realizó por análisis de varianza de una vía (F de Fisher), valorando la evolución de los parámetros estudiados en los corderos desde el nacimiento al mes de vida, además de la influencia del tipo de nacimiento (sencillo o múltiple) y del sexo, considerando una probabilidad del 95% ($p<0,05$).

Resultados

Se ha observado una evolución opuesta de la concentración de selenio entre los corderos y sus madres (figura 1). Durante la primera semana postparto se produce un descenso estadísticamente significativo ($p<0,05$) de la concentración de este mineral en las madres, produciéndose paralelamente un incremento en los corderos. Al cabo de unos días, los niveles maternos se van recuperando y los corderos bajan sus reservas.

En el cuadro 1 aparecen representadas las actividades enzimáticas GSH-Px, CPK, ASAT y las concentraciones de selenio sérico en el conjunto de los corderos, representadas como medias±e.s. y rangos de valores mínimo y máximo.

La concentración media de selenio sérico en los corderos fue de 21,86±0,1 ppb, oscilando entre 19,11 y 23,76 ppb (ambas durante la toma 3). La actividad media de la enzima GSH-Px fue 107,51±7,6 UI/g Hb, observándose grandes fluctuaciones. A par-

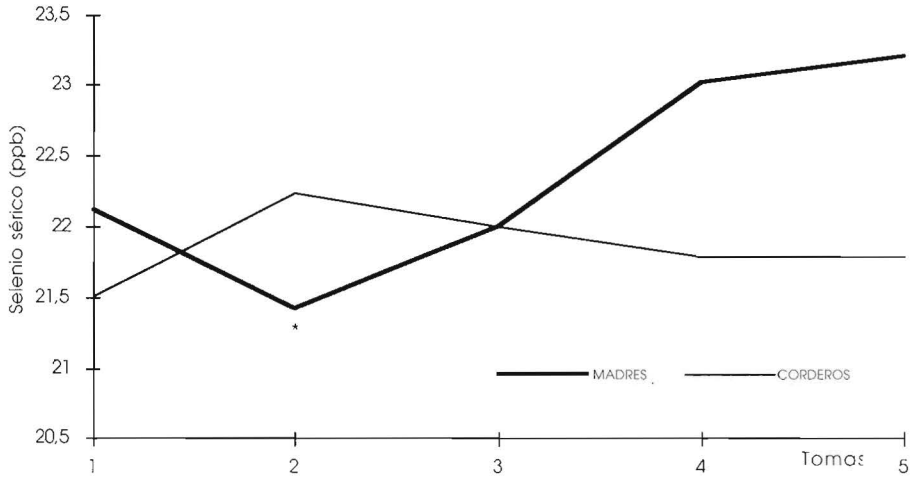


Figura 1. Evolución de la concentración de selenio sérico (ppb) en madres y sus corderos. * (p<0,05)
(Evolution of serum selenium concentration (ppb) in ewes and their lambs)

CUADRO 1
CONCENTRACIÓN DE SELENIO SÉRICO Y ACTIVIDADES GSH-PX, CPK Y ASAT EN EL CONJUNTO DE LOS CORDEROS (MEDIAS±E.S. Y MÍNIMO Y MÁXIMO)
(SERUM SELENIUM LEVELS AND GSH-PX, CPK AND ASAT ACTIVITIES IN ALL LAMBS (MEAN±S.E AND MINIMUM-MAXIMUM)

	Toma 1	Toma 2	Toma 3	Toma 4	Toma 5	Media
Selenio	21,51±0,2	22,24±0,3	22,00±0,4	21,79±0,4	21,78±0,3	21,86±0,1
(ppb)	(20,07-22,14)	(20,76-23,16)	(19,11-23,76)	(20,46-23,64)	(20,34-23,52)	(19,11-23,76)
GSH-Px	90,13±26,5	80,46±7,8	108,56±9,0*	151,54±18,3*	106,86±8,4	107,51±7,6
(UI/g Hb)	(11,38-292,95)	(45,73-126,15)	(44,32-143,31)	(73,31±243,74)	(44,32-132,31)	(11,38-292,85)
CPK	85,57±9,8	58,85±8,1*	58,03±10,3	51,35±9,5	51,39±8,8	61,04±4,4
(UI/l)	(52,34-158,20)	(23,38-110,05)	(24,28-112,19)	(9,63-93,54)	15,13-93,13)	(9,63-158,20)
ASAT	51,1±4,2	47,4±1,9	17,8±3,0*	23,1±1,6	33,1±1,6	34,5±2,2
(UI/l)	(16-62)	(39-57)	(6-40)	(16-31)	(26-41)	(6-62)

* (p<0,05) diferencias significativas respecto a las tomas anteriores

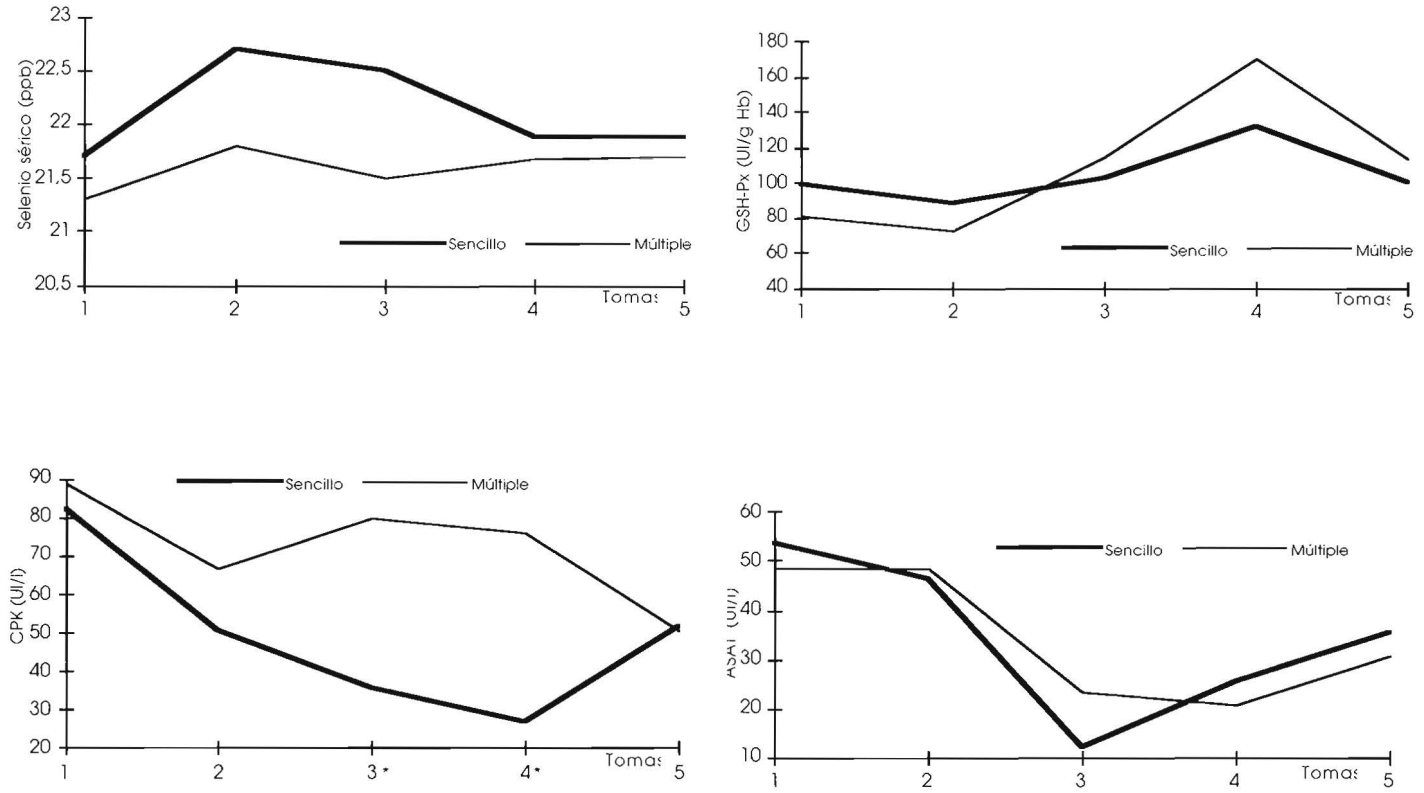


FIGURA 2: Evolución de los niveles de selenio, GSH-Px, y enzimas musculares (CPK y ASAT) en los corderos según nacimiento de parto sencillo o múltiple * (P<0,05)

(Evolution of selenium levels, GSH-Px and muscle enzymes (CPK and ASAT) depending on the type of birth (single or multiple)

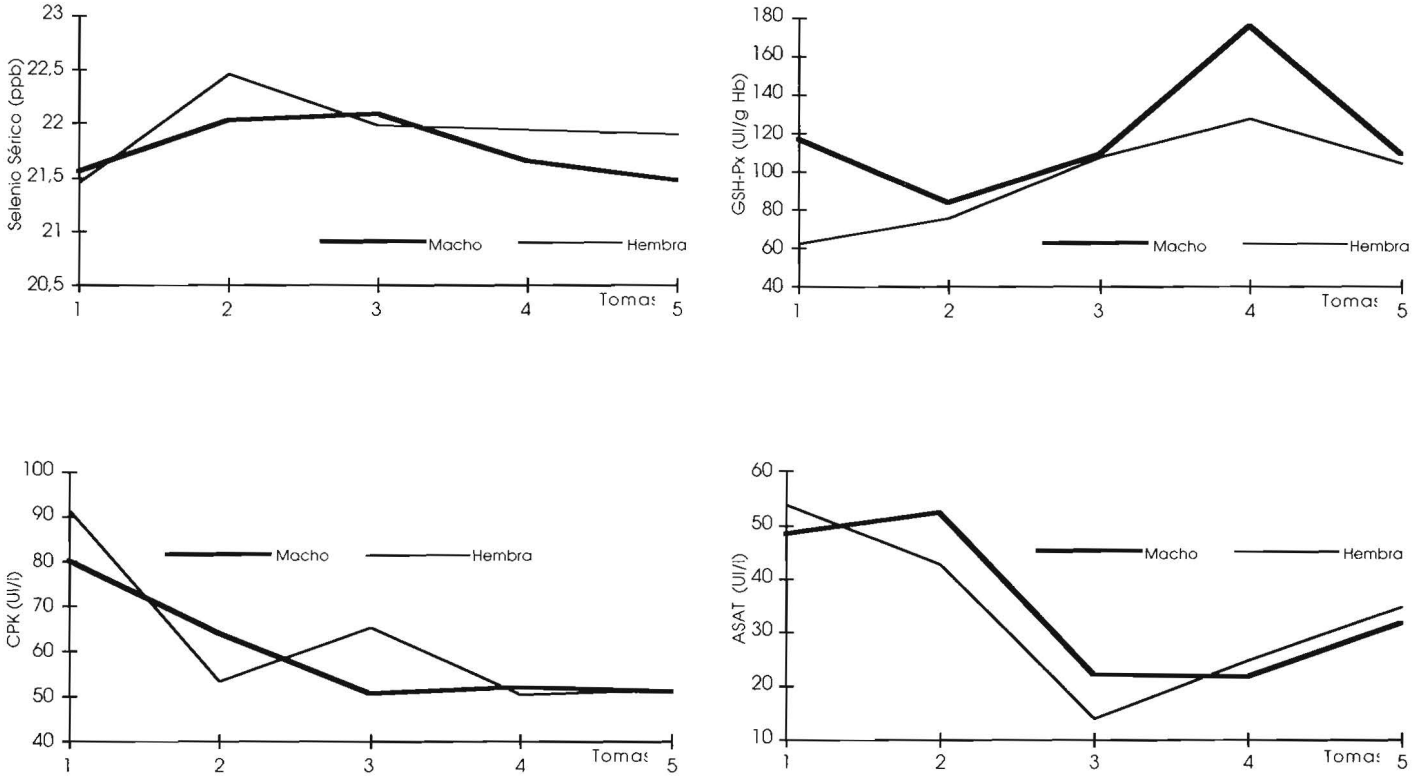


Figura 3. Comparación de los niveles de selenio, GSH-Px y enzimas musculares (CPK y ASAT) según el sexo de los corderos.
(Evolution of selenium levels, GSH-Px and muscle enzymes (CPK and ASAT) depending on the sex)

tir de la segunda semana de vida (toma 3), se produce un incremento de la actividad de esta enzima, siendo esta elevación significativa desde un punto de vista estadístico ($p<0.05$). En cuanto a las enzimas marcadoras de daño muscular (CPK y ASAT), ambas presentan la actividad más elevada en el momento del nacimiento, produciéndose una caída de sus actividades estadísticamente significativa ($p<0,05$), a partir de ese momento.

En la figura 2 se representan los resultados obtenidos al estudiar independientemente los parámetros según el tipo de nacimiento de los corderos. Hemos observado concentraciones inferiores de selenio y actividades superiores de la CPK ($p<0,05$) en los corderos nacidos de parto múltiple, respecto a los nacidos de parto simple. Para la GSH-Px y ASAT los resultados fueron similares entre ambos grupos.

En una evaluación global del estudio de la influencia del sexo de los corderos sobre los parámetros estudiados (figura 3), apreciamos para el selenio y para la enzima ASAT resultados similares entre ambos lotes, de manera que podemos señalar que ambos parámetros no se ven influenciados por este factor. No ocurre así con la enzima GSH-Px, que es superior siempre en los machos, y la CPK que generalmente presenta mayores niveles en las hembras; si bien estas diferencias carecen de significación estadística.

Discusión

– Evolución en función de la edad:

Los niveles de selenio sérico en los corderos de este estudio se sitúan dentro de los márgenes considerados como adecuados según los estudios de FRASER (1982), TURNER (1982), DIXON y DUNNER (1983) y ZACHARA y cols. (1989), considerando estos autores como adecuados aquellos que superan las 20 ppb. No obstante, en los estudios efectuados por WHELAN y cols. (1994) los niveles de normalidad se establecen a partir de los 40 ppb; en base a lo cual estos animales podían ser considerados como deficitarios en este oligoelemento.

Tras el parto (figura 1), existe una fuerte eliminación de selenio, a través del calostro. Esta circunstancia desencadena una caída de la concentración del mineral en suero materno y un incremento en el de los corderos. Posteriormente, el calostro será reemplazado por la leche que contiene menor concentración de este mineral, recuperándose en este momento los valores en la hembra ovina (KOLLER y cols., 1984, PHERSON y cols., 1990). Al mismo tiempo, los corderos desprovistos de una fuente de selenio tan abundante como el calostro, inician un descenso en las concentraciones de este oligoelemento. Parece claro, pues, el papel desempeñado por la secreción calostral en lo que respecta al primer aporte de selenio al animal recién nacido, tal y como ya señalaban KOLLER y cols. (1984), VAN DAEL y cols. (1991), BENEMARIYA y cols. (1993).

La actividad de la enzima GSH-Px se encuentra dentro de los límites fisiológicos según SAÉZ y cols. (1995) (60-120 UI/g Hb). Esta actividad enzimática se va incrementando según avanza la edad de estos animales, lo que nos indica que adquieren una buena defensa frente a daños oxidativos, coincidiendo con los estudios de STOWE y HERDT (1992).

Las enzimas marcadoras de daño muscular (CPK y ASAT), muestran en el momento del nacimiento una actividad más elevada, tras el cual se produce un declive de la

misma. La evolución de la CPK coincide con lo descrito por BOSTEDT y SCHRAMEL (1990) y BRAUN y cols. (1993), permaneciendo dentro de los límites descritos como fisiológicos (<100 UI/l). La enzima ASAT se mantiene, igualmente, dentro de los rangos fisiológicos descritos por KANEKO (1989) y PERNTHANER y cols. (1993) (<100 UI/l). En base a estos resultados, debemos señalar que los niveles de selenio y GSH-Px, no parecen ser desencadenantes de daños musculares. No obstante, creemos que el comportamiento de estas enzimas musculares obedece al nacimiento en si mismo, lo que provoca un estrés oxidativo que origina la salida de estas enzimas citosólicas al espacio extracelular. En el caso de la ASAT permanece elevada durante la primera semana de vida de los corderos, debido a la elevada vida media de esta enzima que se mantiene en suero sanguíneo de 3 a 10 días en ganado ovino (BLOOD y cols., 1992).

– Evolución según tipo de gestación:

Los corderos hasta el mes de edad se sustentan a partir de sus madres. Las hembras que han mantenido una gestación múltiple han sufrido un mayor consumo de selenio ya que se debe repartir a ambos fetos (LANGLANDS y cols., 1991), y por ello presentan menor nivel del mineral los corderos procedentes de parto múltiple. Estos animales a su vez, presentaron una menor protección frente a daños oxidativos y como consecuencia se produjo liberación al torrente circulatorio de CPK (BLOOD y cols., 1992). No obstante, en este grupo de animales la concentración del mineral parece ser adecuada, ya que la actividad de esta enzima se encuentra dentro de los límites fisiológicos (<100 IU/l). Las actividades GSH-Px y ASAT se presentaron muy homogéneas para ambos grupos.

– Evolución según sexo:

Los corderos macho presentan generalmente mayor desarrollo corporal que las hembras, y como consecuencia un desarrollo superior de la placenta, lo que conduce a una mayor vehiculación de GSH-Px de la madre al feto (BOSTEDT y SCHRAMEL, 1990). Este aporte superior de GSH-Px proporciona una fuerte protección frente a daños oxidativos y consecuentemente una menor liberación de CPK.

Conclusión

Los niveles de selenio en este grupo de corderos de raza Gallega parecen ser adecuados, ya que tanto los niveles de selenio, como el resto de parámetros indicativos de patologías oxidativas (GSH-Px) y muscular (CPK y ASAT) se mantienen dentro de la normalidad, observando a su vez que la gestación múltiple condiciona las reservas de selenio en la descendencia.

Bibliografía

BENEMARIYA H., ROBBERECHT H., DEELSTRA H.,1993. Zinc, copper, and selenium in milk and organs of cow and goat from Burundi, Africa. Sci. Total Environ. 128 (1), 83-98.

BLOOD D.C., RADOSTITS O.M., ARUNDEL J.H., GAY, C.C. 1992. Medicina Veterinaria. 7ª ed.Vol I. Ed. Interamericana. Madrid.

BODTEDT H., SCHRAMEL., 1990. The importance of selenium in the prenatal and postnatal development of calves and lambs. Biol. Trace Elem. Res. 24 (2), 163-171.

BRAUN J.P., LEFEBVRE H.P, HAMLIRI A., KESSABI., TOUTAIN P.L., 1993. La créatine kinase du mouton: une revue. Revue Méd. Vét. 144 (8-9), 659-664.

DIXON R., DUNNER K., 1983. Unit changes in trace element analyses. Surveillance. 10 (2), 6-8.

FRASER A., 1982. Production related reference ranges. Surveillance. 9, 4-7.

HAINLINE, A., 1958. Hemoglobin in standard methods of clinical chemistry. D.Selignon. Vol. 2. Academic Press. New York.

JIMENEZ A., GONZÁLEZ M., ANDRÉS S., 1991. La deficiencia de selenio. Importancia de la Enfermedad del músculo blanco en las producciones ovinas. Tratado de Patología y Producción ovina (OVIS). 12, 9-18.

KANEKO J.J., 1989. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 4th ed. Ed. Academic Press. Inc. London.

KOLLER L.D., 1981. Influence of selenium on livestock. Mod. Vet. Proc. 62:25.

KOLLER L.D., WHITBECK G.A., SOUTH P.J., 1984. Transplacental transfer and calostral concentrations of selenium in beef cattle. Am. J. Vet. Res. 45, 2507-2510.

LANGLANDS J.P., DONALD G.E., BOWLES J.E., SMITH A.J., 1991. Subclinical selenium insufficiency 3. The selenium status productivity of lambs born to ewes supplemented with selenium. Aust. J. Exp. Agric. 31 (1), 37-43.

PERNTHANER A., BAUMGARTNER W., JAHN J., Plautz W., ANGEL T., 1993. Investigations of haematological parameters, mineral and metabolite concentrations, and enzyme activities in sheep. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift. 106 (3), 73-79.

PHERSON B., HAKKARAINEN J., BLOMGREN L., 1990. Vitamin E status in newborn lambs with special reference to alfatocopherol acetate supplementation in late gestation. Acta Vet. Scand. 31 (3), 359-367.

PLAGIA D.E., VALENTINE W.N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterizacion of erythrocite glutathione peroxidase. J. Lab. Clin. Med. 70, 158.

RAMÓN-GIMENEZ J.R., 1993. Radicales libres y antioxidantes en clínica humana. Ed. IDEPSA, Madrid.

ROTRUCK J.T., POPE A.L., CANTHER H.E., 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. Science.179, 588-590.

SAEZ T., MARCA M.C., RAMOS J.J., VERDE M.T., FERNÁNDEZ., SANZ M.C., 1995. Detección de carencias de selenio en el ganado ovino de la provincia de Zaragoza mediante la medición de la actividad glutatión-peroxidasa seleno-dependiente. ITEA, Prod. An. Vol.91A, (1), 5-11.

SÁNCHEZ GARCÍA L., IGLESIAS A., VALLEJO M., 1989. Raza Ovina Gallega. Diputación Provincial de Lugo.

STOWE H.D., HERDT T.H.,1992. Clinical assessment of selenium status of livestock. J. Anim. Sci. 70, 3928-3933.

TURNER K., 1982. Molecular units and significant figures in trace elements analysis. Surveillance. 9, 17-20.

VAN DAEL P., VLAEMYNCK G., VAN RENTERGHEM R., DEELSTRA H., 1991. Selenium content of cows milk and its distribution in protein fractions. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 192, 422-425.

WHELAN B.R., PETER D.W., BARROW N.J., 1994. Selenium fertilicers for pastures grazed by sheep. 1. Selenium concentration in whole blood and plasma. Aust. J. of Agric. Res. 45 (4), 863-875.

ZACHARA B.A., BOROWSKA K., ZAMORSKI R., KAPTUR M., 1989. Blood selenium status, glutathione peroxidase, and creatine kinase activities in ewes during pregnancy and lactation and in lambs. 6th International Trace Element Symposium, Leipzig . 3. 813-821.

(Aceptado para publicación el 1 de julio de 1996)

ITEA (1996), Vol. 92A N.º 2, 143-154

FACTORES DETERMINANTES DE LA INGESTIÓN DE FORRAJES POR EL VACUNO

R. Ferrer[1, 2]
I. Casasús[2]
M. Petit[1]

1. LAHM INRA de Theix (63122 Francia)
2. SIA - D. G. Aragón - Apdo. 727 - 50080 Zaragoza

RESUMEN

La capacidad de ingestión de un lote de 8 novillas Charolesas (de 370 a 470 kg) se midió individualmente en 3 periodos (de 4 a 8 semanas) separados entre si por 4 meses. En el último periodo se añadió un lote de vacas secas (740 kg) y otro de terneras (300 kg), con 8 animales en cada caso. En el primer y último periodo se utilizó un mismo heno y en el segundo una hierba verde, ambos de pradera natural.

Sobre 212 datos bibliográficos de cantidades ingeridas en pastoreo por bovinos se analizó estadísticamente su relación con el peso (de 80 a 700 kg), la edad o la digestibilidad del pasto.

El peso explicó mejor las diferencias de ingestión entre animales que la edad. Solamente se observó un efecto concomitante de la edad con el peso en los datos bibliográficos ($P<0,01$). La ingestión relativa al peso disminuyó con el desarrollo del animal. Los forrajes más digestibles se ingirieron mejor en todos los casos. El coeficiente de alometría de la ingestión en función del peso (de 1 a 0,77) disminuyó con el formato del animal, y lo hizo con mayor rapidez en las razas precoces (lecheras). Ello implica que el desarrollo de la capacidad de ingestión es más tardío en las razas cárnicas, lo que hace más sensibles a los animales jóvenes cuando ingieren forrajes de calidad mediocre.

Palabras clave: Forraje, Vacuno Charolés, Ingestión, Peso vivo, Alometría.

SUMMARY

Intake capacity of 8 heifers (from 370 to 470 kg) was individually recorded during 3 periods (4 to 8 weeks) at 4-month intervals. Intake capacity of 8 mature dry cows (740 kg) and 8 female calves (300 kg) was also measured in the last period. The animals were fed the same hay in the first and the last period, and grass in the second period, both cut from a natural meadow.

Information was also collected from published intake data of cattle (80 to 700 kg) at pasture, in order to calculate relationships between herbage intake and live weight, age of cattle, and herbage digestibility.

Live weight explained better intake variability than age of cattle. A concomitant effect of age was also significant in the bibliographic data base ($P<0.01$). Intake per kg live weight decreased as the animal grew. More digestible forages were eaten in grea-

ter amounts. Allometric coefficient of intake in relation to live weight (from 1 to 0.77) fell as cattle increased in size, but faster in early-maturing breeds (dairy breeds). This means that development of intake capacity occurs later in beef cattle, and thus younger animals are more sensitive when they are fed low quality forages.

Key words: Forage, Charolais cattle, Intake, Live weight, Allometry.

Introducción

En el contexto económico actual, el mantenimiento de una renta suficiente en ganadería pasa esencialmente por la extensificación del factor "tierra" frente a los factores "trabajo" y "capital". Esto conduce a aumentar la superficie explotada y a reducir los costes de producción. En estas nuevas condiciones el mantenimiento de la productividad del ganado deberá tener cada vez más en cuenta la rusticidad de los animales. El término rusticidad engloba varias aptitudes y pone en juego un gran número de funciones biológicas. La capacidad de ingestión y más precisamente la aptitud para ingerir forrajes de muy variada calidad es un determinante de la rusticidad de los rumiantes. La cantidad de elementos nutritivos que un animal en este tipo de medio puede obtener del alimento depende en gran parte de su capacidad de ingestión que está correlacionada positivamente con la capacidad para digerir los componentes fibrosos.

El peso, máxime cuando se trata de raciones a base de forrajes, es el factor determinante de la capacidad de ingestión de los bovinos, y puede representar más del 80 % de la variabilidad genética y fenotípica de la capacidad de ingestión entre razas (TAYLOR *et al.*, 1986). Para un mismo peso, la edad también puede promover las cantidades voluntariamente ingeridas, lo cual es un reflejo del diferente estado de desarrollo o engrasamiento de los animales. Las cantidades ingeridas dependen de la naturaleza de la ración, ya que la ingestibilidad está ligada estrechamente a la digestibilidad (JARRIGE *et al.*, 1986).

El objetivo de este estudio fue precisar las relaciones entre la ingestión y las características (esencialmente el peso) de los bovinos en diferente estado de desarrollo. El trabajo está basado sobre un ensayo experimental en estabulación y el análisis estadístico de una base de datos bibliográficos de ingestión en pastoreo. En el ensayo experimental se midieron individualmente sobre un mismo lote de novillas las cantidades ingeridas de forraje en tres periodos (desde 50 a 70 % del peso adulto de los animales). En el último periodo entraron también en control un lote de terneras y otro de vacas adultas secas. Se discuten las implicaciones prácticas de los resultados obtenidos en el manejo de los rebaños en los nuevos sistemas de producción (extensificación) basados en el aprovechamiento de forrajes.

Material y métodos

Estudio experimental:

Los animales utilizados en esta experiencia fueron todos de raza Charolesa y provenientes de un mismo rebaño experimental situado en una zona de montaña (1100 m,

INRA de Theix, Francia). Este rebaño se maneja según un esquema clásico de partos al final del invierno, amamantamiento en pasto y con destete en otoño (entre los 6 y 8 meses de edad).

Se utilizó un mismo lote de 8 novillas sobre las que se midió individualmente la capacidad de ingestión durante tres periodos separados entre sí por 4 meses. En el último periodo se controlaron también un lote de vacas adultas secas y otro de terneras (8 animales en cada uno). En el primer y último periodo se utilizó un mismo heno y en el segundo periodo una hierba verde, ambos cortados en estado de espigado en praderas naturales de montaña. Aunque transcurrieron 8 meses y se utilizó el mismo heno, el almacenamiento se realizó en buenas condiciones. Los análisis revelaron que no existieron diferencias significativas en su composición química debidas al almacenaje, por lo que se presentaron los valores medios a título indicativo en el Cuadro 1. Los forrajes fueron distribuidos a voluntad (10 a 15 % de rechazo), 2 veces al día. El heno fue complementado diariamente con 200 g de torta de soja 48 y con 100 g de un complemento vitamínico-mineral por animal para asegurar un correcto funcionamiento de las fermentaciones ruminales. Las características de los animales al inicio de los controles se describen en el Cuadro 2.

Los controles se realizaron durante 8, 4 y 6 semanas consecutivas en el primer, segundo y tercer periodo respectivamente, donde las 2 primeras semanas se consideraron siempre como fase de adaptación. Las cantidades de forraje ofrecidas y rechazadas fueron pesadas 5 días por semana. El contenido en materia seca (MS) de los alimentos ofrecidos y rechazados fue estimado 2 veces por semana sobre el heno y la torta de soja, y diariamente en el caso de la hierba cortada. Una muestra fue conservada para determi-

CUADRO 1
CARACTERÍSTICAS DE LOS FORRAJES UTILIZADOS EN LA EXPERIENCIA
TABLE 1
CHARACTERISTICS OF FORAGES EMPLOYED IN THE EXPERIMENT

	Heno	Hierba
Composición química (g / kg MS)		
MO	920	906
PB	122	137
FB	335	306
Valor nutritivo (1)		
dMO	0,57	0,6
UFL	0,69	0,931
PDIN	76	87
PDIE	81	89

(1) Medido sobre carneros castrados: dMO= digestibilidad MO; UFL= Unidad Forrajera Leche; PDIN, PDIE = proteínas digestibles en el intestino dependientes del nitrógeno degradable (N) o de la energía (E) del alimento.

CUADRO 2
CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES UTILIZADOS Y CANTIDADES INGERIDAS DE FORRAJES
TABLE 2
ANIMAL CHARACTERISTICS AND FORAGE INTAKE

Forraje	Periodo1 Heno	Periodo 2 Hierba	Periodo 3 Heno		
Animal	Novillas	Novillas	Vacas	Novillas	Terneras
Pero (kg)	367±45,1	406±46,2	737±30.,4	470±53,1	298±16,1
Edad (meses)	12±1,2	16±1,2	70±23,5	20±1,3	9±0,3
GMD (g/día)(1)	929±158,4		892±179,5		982±83,6
Ingestión					
kg MS/día	6,2a	7,8b	12,3c	8,7b	5,6a
g MS/kg PV/día	16.8a	19,1b	16,7a	18,6b	18,8b
ULB(2)	7,1	7,8	14,2	8,8	5,9

(1) Ganancia Media Diaria hasta el destete
(2) Capacidad de ingestión teórica medida en Unidades Lastre para Bovinos (INRA, 1988)

nar la concentración en materia orgánica (MO), fibra bruta (FB) y proteína bruta (PB). Se calculó el valor nutritivo de cada forraje a partir de la digestibilidad *in vivo* de la MO (ANDRIEU y DEMARQUILLY, 1987). Esta fue estimada en cada forraje utilizando 6 carneros castrados durante 7 días de medidas después de un periodo de adaptación de 14 días.

Los animales se pesaron cada 3 semanas y al inicio y final de los periodos de control. Las ganancias de peso fueron calculadas por regresión lineal sobre el conjunto de pesos durante la experiencia con el fin de limitar las variaciones aleatorias.

Estudio bibliográfico

Se recopilaron un total de 212 datos (18 referencias bibliográficas)[1] de cantidades ingeridas en pastoreo por bovinos de pesos comprendidos entre 80 y 700 kg La mayoría de los datos pertenecían a trabajos realizados en Centros británicos (Hurley, Wye College, MLURI,...) y sobre praderas mono-específicas de ray-grass.

Cada dato correspondió a una media de estimaciones hechas sobre varios animales. Los tratamientos experimentales y los periodos de medidas de un mismo ensayo fueron considerados separadamente. En todos los casos las cantidades ingeridas fue-

1. Lista de referencias bibliográficas: Baker et al. 1981a, 1981b, 1985; Hodgson, 1968; Hodgson et al. 1971, 1977; Hodgson y Jamieson. 1981; Holloway y Butts. 1983; Holmes et al. 1961; Jamieson y Hodgson. 1979a, 1979b; Jones et al., 1965; Martin et al., 1955; Vicini et al., 1982; Wanyoike y Holmes. 1981; Wilkinson y Prescott. 1970; Wright et al. 1989; Zoby y Holmes, 1983.

ron estimadas con marcadores digestivos (Cr_2O_3 junto con digestibilidad *in vitro* y recientemente alcanos) durante un periodo mínimo de muestreo de heces de 5 días.

Las comparaciones entre animales de diferentes formatos en la misma referencia representaron 30 % de los datos. Las edades comprendidas entre 6 meses y 2 años, y los pesos inferiores a 450 kg estaban bien representados, pero los datos correspondientes a animales adultos son más escasos. Los genotipos lecheros representaron el 70 % de los datos, el resto correspondían a cruces de razas lecheras con razas cárnicas especializadas.

Tratamiento de los datos:

Los resultados de ingestión fueron tratados por análisis de varianza (GLM; SAS, 1988) teniendo en cuenta en los modelos el periodo, el tipo de animal, el peso vivo, la edad, la ganancia media diaria hasta el destete o la digestibilidad del pasto en el caso del estudio bibliográfico. Para cada modelo se retuvieron solamente los factores e interacciones significativas ($P<0,05$).

Después de transformar logarítmicamente las variables, se expresó la ingestión (I, kg MS / día) en función del peso de los animales (PV, kg) según el modelo :

$$\log_e I = \alpha + \beta \times \log_e PV + \epsilon$$

En el caso del estudio bibliográfico no se tuvo en cuenta el factor "referencia bibliográfica" en el modelo ya que ello habría podido inducir errores en las estimaciones debido a que todas las referencias no cubrían toda la gama de pesos o de ingestión. Finalmente, tampoco fueron considerados en el cálculo los datos provenientes de animales que tuvieron ganancias de peso inferiores a 0,4 o superiores a 0,7 kg/día en los meses previos.

Resultados

Estudio experimental

Aunque se tomó la precaución de no considerar las ingestiones de las 2 primeras semanas de medidas, durante el primer periodo se observó en las novillas un incremento progresivo de la ingestión de heno (39±7,6, g MS / día), que no se observó posteriormente.

La ingestión de hierba por kg de peso fue superior, aunque no siempre significativamente, a la ingestión de heno en cualquier tipo de animal o periodo (Cuadro 2). Las cantidades ingeridas de forraje por kg de peso de las novillas en el primer periodo y de las vacas en el último fueron inferiores a las cantidades ingeridas por las novillas y las terneras en los 2 últimos periodos.

En tan solo 8 meses, la capacidad de ingestión de estas novillas se incrementó un 40 % mientras que su peso lo hizo en un 28 %. Cuando se consideraron solamente las novillas, el coeficiente de regresión entre cantidades ingeridas y el peso de los animales fue similar dentre de cada uno de los 3 periodos (13,3, 15,4 y 13,1; coeficiente global: 14,1±2,51 g MS por cada kg de incremento de peso), explicando el modelo 83 % de la variación de ingestión. La edad del animal junto con el peso, no logró aumentar el porcentaje de varianza explicada por el modelo. En el primer periodo y para un mismo peso, las novillas con una ganancia media diaria hasta el destete superior ingirieron más forraje (3±0,9 g de MS por g de ganancia de peso).

Finalmente, utilizando las ingestiones individuales por periodo de todos los animales y después de transformar logarítmicamente las variables se observó que el incremento de la ingestión de forrajes (I) no era totalmente lineal con el peso de los animales (PV):

$$I \text{ (kg de MS)} = 0{,}034 \times PV^{0.89 \pm 0.045};$$

R^2=0,91 D.E.R. = 0,71 (ecuación 1)

El incremento fue lineal cuando no fueron considerados los datos de ingestión de las vacas:

$$I \text{ (kg de MS)} = 0{,}022 \times PV^{0.97 \pm 0.086};$$

R^2=0,79 D.E.R. = 0.66 (ecuación 2)

Estudio bibliográfico:

Los datos cubrían una amplia gama de digestibilidades (entre 0,60 y 0,84), si bien en el 93 % de los trabajos se situó entre 0,66 y 0,81 (Figura 1). La distribución de pesos y cantidades ingeridas presentaron formas diferentes, lo cual induce a pensar que ciertos animales ligeros ingerían mucho en relación a su peso y viceversa en el caso de los más pesados. Esto condujo a elegir animales con un pasado nutricional "normal" (ganancias medias diarias previas entre 400 y 700 g.) para los cálculos. La relación obtenida fue:

$$I \text{ (kg de MS)} = 0{,}077 \times PV^{0.77 \pm 0.033};$$

R^2=0,81 D.E.R. = 0.97 (ecuación 3)

Cuando se dejaron de lado los datos correspondientes a los animales adultos, la relación fue:

$$I \text{ (kg de MS)} = 0.058 \times PV^{0.82 \pm 0.043};$$

R^2=0.77 D.E.R. = 0,88 (ecuación 4)

Se calculó una última relación teniendo en cuenta solamente los animales con un peso inferior a 300 kg:

$$I \text{ (kg de MS)} = 0{,}022 \times PV^{1{,}02 \pm 0{,}060};$$

R^2=0,76 D.E.R. = 0,73 (ecuación 5)

Aunque la edad y el peso de los animales están evidentemente correlacionados y ello puede inducir a que las estimaciones de los coeficientes de regresión no sean suficientemente exactas, se puede considerar en este caso que la relación fue relativamente modesta (R^2=0,62). Se empleó un modelo de regresión múltiple para describir la ingestión en función del peso (PV, kg), la edad (ED, meses) y la digestibilidad del pasto (DIG, %) que era la variable vegetal más frecuentemente citada:

$$I \text{ (kg MS/día)} = -2{,}92(\pm 1{,}054) + 0{,}016(\pm 0{,}0009) \times PV + 0{,}26(\pm 0{,}030) \times ED\ 0004(\pm 0{,}00004) \times (PV \times ED) + 0{,}039(\pm 0{,}0140) \times DIG$$

r^2 = 0,90; D.E.R. = 0,81 (ecuación 6)

o bien:

$$I \text{ (g MS/kg PV/día)} = -7{,}17(\pm 4{,}760) + 0{,}31(\pm 0{,}135) \times ED - 0{,}0006(\pm 0{,}0002) \times (PV \times ED) + 0{,}39(\pm 0{,}064) \times DIG$$

r^2 = 0,48; D.E.R. = 3,70 (ecuación 7)

Discusión

Las características de los 2 forrajes inducen a pensar que la hierba con una digestibilidad más alta tenía un valor lastre inferior y esta fue la causa por la cual sus ingestiones relativas fueron las más altas (JARRIGE *et al.*, 1986). La larga duración del primer periodo de medidas puede explicar por qué se detectó un incremento progresivo de la ingestión, ya que el destete y los trastornos asociados que conlleva habían tenido lugar 4 meses

antes, lo que se considera un periodo suficiente. En cualquier caso esto no justifica totalmente ingestiones por kg de peso similares a las observadas en vacas en el último periodo. En el tercer periodo la ingestión relativa al peso fue inferior en los adultos con respecto a los jóvenes (novillas y terneras), lo que puede deberse fundamentalmente a la disminución de las necesidades relativas del animal con el grado de desarrollo (FORBES, 1986). En cualquier caso y aunque se trate de forrajes, resultaría demasiado

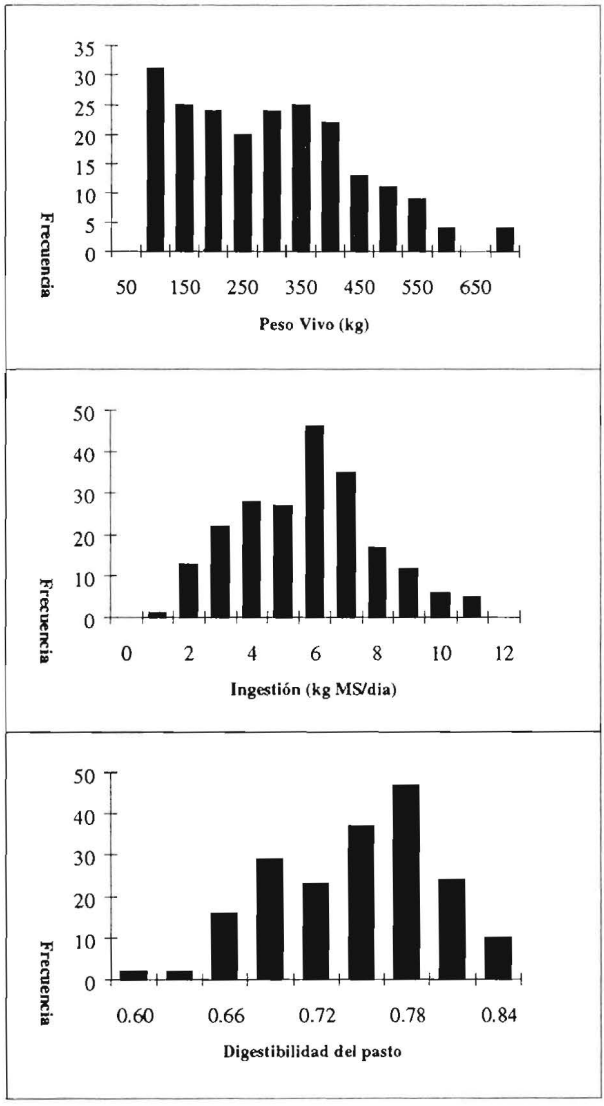


Figura 1. Principales características de los datos que constituyen la base bibliográfica

simplista atribuir todo el control de la ingestión a una limitación física. Es bien conocida la existencia de un control metabólico del apetito, algunos de cuyos factores más determinantes son el estado fisiológico o la condición corporal en la que se encuentren los animales (FORBES, 1986). Ello podría explicar las leves diferencias entre la ingestión observada y la estimada en las tablas INRA de capacidad de ingestión (INRA, 1988).

El incremento de la ingestión con el peso de las novillas a lo largo de los tres periodos fue el mismo que el observado por TROCCON (1987) para este tipo de animales ingiriendo forrajes. Una mayor ingestión de hierba durante la lactancia para un mismo consumo de leche debería conducir a ganancias superiores hasta el destete (LE DU y BAKER, 1979). Esta podría ser la causa de la relación positiva entre dicha ganancia y la capacidad de ingestión posterior de las novillas en el primer periodo. Ello puede inducirnos a pensar en razones genéticas que determinan la variabilidad individual de la capacidad de ingestión y que merecerían estudios específicos.

De las relaciones de alometría obtenidas en ambos estudios (experimental y bibliográfico) se deduce en cualquier caso que el coeficiente de alometría disminuye con la edad de los animales, de acuerdo con medidas realizadas en establo (TAYLOR *et al.*, 1986). No obstante, parece ser que esta disminución es más rápida cuando se trata de razas lecheras, por consiguiente más precoces. En tanto en cuanto la ingestión se incrementaba linealmente con el peso, la constante de proporcionalidad fue la misma en todos los casos (ecuaciones 2 y 5). Ello ocurrió en genotipos lecheros hasta los 300 kg, coincidiendo con el valor propuesto por TROCCON (1987), y hasta pesos superiores en la raza Charolesa en este estudio. Estas diferencias raciales se corroboran con las diferencias de evolución del contenido digestivo con el peso entre animales de raza Frisona y Charolesa observadas por ROBELIN (1986). D'HOUR *et al.* (1991) obtuvieron en razas lecheras francesas en estabulación un coeficiente de alometría de 0,80, próximo al obtenido aquí para animales en pastoreo y provenientes de una base donde predominaban los genotipos lecheros (ecuación 3). Ambos son también próximos al valor de referencia en la bibliografía (0,75) para expresar la ingestión de animales que difieren mucho en peso (INRA, 1978; ARC, 1980). De la ecuación 3 se dedujo que los bovinos en pastoreo ingieren aproximadamente 80 g de MS por kg de peso metabólico, valor ligeramente inferior al propuesto por DULPHY et al. (1987) como ingestibilidad de una gramínea en estado precoz distribuida a novillas de recría.

Las razas cárnicas y especialmente la Charolesa tienen un desarrollo más tardío que las razas lecheras y ya desde una edad muy temprana se han observado retrasos en el desarrollo de la capacidad de ingestión (PETIT, 1988). Los coeficientes de alometría en el estudio experimental (ecuaciones 1 y 2) fueron superiores a los obtenidos en razas lecheras tanto en establo como en pastoreo. Estas relaciones de alometría no fueron diferentes de la propuesta por AGABRIEL *et al.* (1987) para hembras bovinas de carne de formatos similares y alimentadas con heno. Coincidieron también con las relaciones obtenidas en hembras de la misma raza en pastoreo con una ingestión no limitada por la cantidad de pasto disponible (FERRER y PETIT, 1995; FERRER *et al.*, 1995).

El incremento de ingestión con el peso de las novillas no fue diferente al obtenido en la base bibliográfica. No obstante, debido a que en esta última el pasado nutricional de los animales era muy diverso, se observó

un efecto concomitante de la edad de los animales. El coeficiente atribuido a la edad fue semejante al calculado por AGABRIEL *et al.* (1987) en novillas jóvenes. Sin embargo existió una interacción entre ambos factores que hizo que la magnitud de ambos efectos disminuyera progresivamente, lo cual está en relación con la disminución del coeficiente de alometría.

Gracias a la amplia gama de digestibilidades en la base bibliográfica se pudo poner en evidencia su efecto sobre la ingestión independientemente del peso/edad de los animales. El valor obtenido fue el mismo que el calculado por BINES *et al.* (1969) en el caso de vacas delgadas alimentadas en establo, y semejante al propuesto por DULPHY *et al.* (1987) para novillas de recría que recibían heno y por Hodgson et al. (1977) para terneros destetados en pastoreo (0,33 y 0,26 g MO / kg PV/ punto digestibilidad respectivamente). Desde los trabajos de CONRAD *et al.* (1964) perdura la idea de que los mecanismos de control metabólico de la ingestión se ponen en marcha cuando la digestibilidad de la ración sobrepasa el 65-70 %. Más recientemente KETELAARS y TOLKAMP (1992) se mostraron críticos con este argumento. Los datos de esta revisión bibliográfica apoyaron la hipótesis de estos últimos autores, la ingestión puede incrementarse en algunos casos por encima de una digestibilidad del 80 % (Figura 2).

En definitiva, la capacidad de ingestión es una característica que se desarrolla de forma desacelerada desde que el animal empieza a consumir elementos sólidos, desarrollo que es más lento en el caso de las razas cárnicas (menos precoces). La cantidad de elementos nutritivos que un animal es capaz de extraer de un pasto mediocre (característico del pastoreo extensivo) depende de su capacidad de ingestión. Las necesidades relativas de los animales disminuyen a medida que aumentan en peso. De la relación entre ambas se deduce que si se pretende obtener un mismo crecimiento (ej. 500 g/día) para animales de diferentes pesos, mantener este objetivo solamente es posible con forrajes de valor nutritivo diferente. Basándose en las necesidades nutritivas del INRA (1988) para crecimiento de 500 g/día (recomendable para terneras de recría) y en la capacidad de ingestión de los animales, se necesitaría un forraje con una densidad energética y proteica superior para que los animales más ligeros alcanzaran este objetivo (0,68 UFL y 64 g PDI por ULB a 300 kg, frente a 0,62 UFL y 56 g PDI por ULB a 470 kg)[2]. Ello debe inducir a la cautela en el manejo de los rebaños de vacuno de carne en régimen extensivo si se quiere que los rendimientos no se vean afectados. La complementación de estos animales más sensibles con concentrado para alcanzar los crecimientos recomendados puede ser una alternativa.

Agradecimientos

Se agradece la colaboración de todo el equipo de la finca experimental INRA de Laqueuille (Theix, Francia) por su colaboración en el desarrollo de esta experiencia. Este trabajo se realizó gracias a la atribución de sendas becas del CONAI de la

2. UFL= Unidad Forrajera Leche: valor energético neto de 1 kg de cebada para la producción de leche /1.700 kcal). PDI= Proteínas Digestibles en el Intestino. ULB= Valor Lastre del forraje para Bovinos (INRA, 1988).

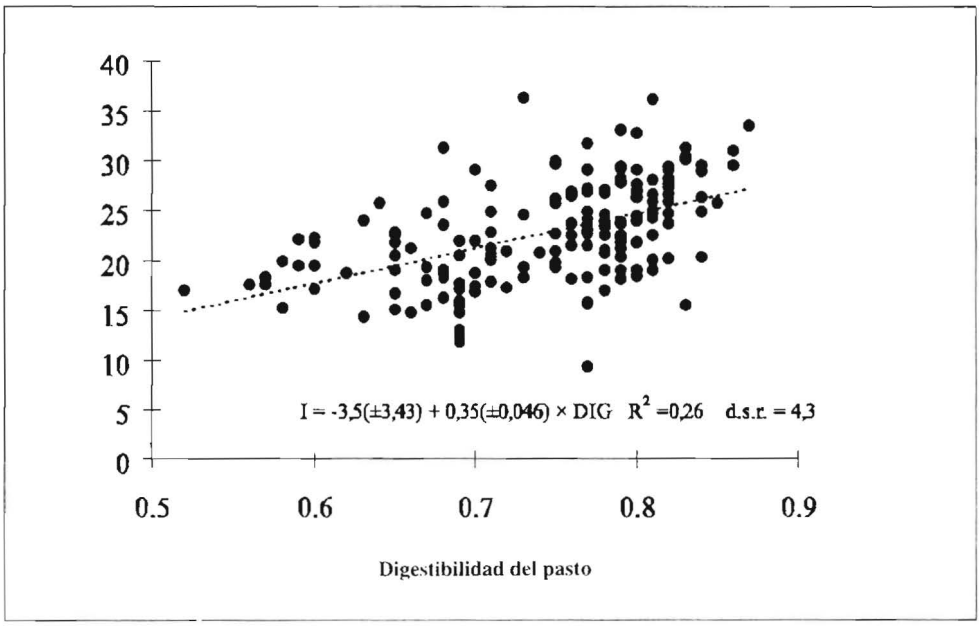


Figura 2. Relación entre la ingestión y la digestibilidad del pasto en la base de datos bibliográfica

Diputación General de Aragón y del INIA, y a los acuerdos bilaterales INIA-INRA.

Bibliografía

AGABRIEL J., D'HOUR P., PETIT M. 1987. Influence de l'age et de la race sur la capacité d'ingestion des femelles bovines. Repr. Nutr. Develop., 27, 211-212.

ANDRIEU J., DEMARQUILLY C. 1987. Valeur nutritive des fourrages : tables et prévision. Bull. Techn. CRZV Theix INRA., 70, 61-74.

ARC 1980. The nutrient requirements of ruminant livestock. Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham Royal.

BAKER R.D., ALVAREZ F., LE DU Y.L.P. 1981a. The effect of herbage allowance upon the herbage intake and performance of suckler cows and calves. Grass and Forage Sci., 36, 189-199.

BAKER R.D., LE DU Y.L.P., ALVAREZ F. 1981b. The herbage intake and performance of set-stocked suckler cows and calves. Grass and Forage Sci., 36, 201-210.

BAKER R.D., YOUNG N.E. and LAWS J.A. 1985. Changes in the body composition of cattle exibiting compensatory growth and the modifying effects of grazing management. Anim. Prod., 41, 309-321.

BINES J.A., SUZUKI S., BALCH C.C. 1969. The quantitative significance of long-term regulation of food intake in the cow. Brit. J. Nutr., 23 , 695-704.

CONRAD H.R., PRATT A.D., HIBBS J.W. 1964. Regulation of feed intake in dairy cows. Change in importance of physical and physiological factors with increasing digestibility. J. Dairy Sci., 47, 54-62.

D'HOUR P., COULON J.B., GAREL J.P. 1991. Capacité d'ingestion des génisses : influence de la race, de l'age et de la qualité du foin. Ann. Zootech., 40 , 171-179.

DULPHY J.P., FAVERDIN PH., MICOL D., BOCQUIER F. 1987. Révision du système des Unités d'Encombrement (UE). Bull. Techn. CRZV Theix., 70 , 35-48.

FERRER R., PETIT M. 1995. The influence of animal age and sward height on the herbage intake and grazing behaviour of Charolais cattle. Anim. Sci., 61, 497-506.

FERRER R., PETIT M., D'HOUR P. 1995. The effect of sward height on grazing behaviour and herbage intake of three sizes of Charolais cattle grazing cocksfoot swards. Anim. Sci., 61, 511-518.

FORBES, J.M. 1986. The voluntary food intake of farm animals. Butterwoths, London.

HODGSON J. 1968. The relationship between the digestibility of a sward and the herbage consumption of grazing calves. J. Agric. Sci., Camb., 70, 47-51.

HODGSON J. 1968. The relationship between the digestibility of a sward and the herbage consumption of grazing calves. J. Agric. Sci., Camb., 70, 47-51.

HODGSON J., TAYLER J.C., LONSDALE C.R. 1971. The relationship between intensity of grazing and the herbage consumption and growth calves. Anim. Prod., 26, 231-237.

HODGSON J., JAMIESON W.S. 1981. Variations in herbage mass and digestibility, and the grazing behaviour and herbage intake of adult cattle and weaned calves. Grass and Forage Sci., 36, 39-48.

HODGSON J., RODRIGUEZ CAPRILES J.M., FENLON J.S. 1977. The influence of sward characteristics on the herbage intake of grazing calves. J. Agric. Sci., Camb., 89, 743-750.

HOLMES W., JONES J.G.W., DRAKE-BROCKMAN R.M. 1961. The feed intake of grazing cattle. II. The influence of size of animal on feed intake. Anim. Prod., 3, 251-260.

HOLLOWAY J.W., BUTTS W.T., 1983. Phenotype x nutritional environment interactions in forage intake and efficiency of angus cows grazing fescue-legume or fescue pastures. J. Anim. Sci., 56, 960-971.

INRA 1978. Alimentation des Ruminants. (Ed. R. Jarrige) INRA Paris.

INRA 1988. Alimentation des bovins, ovins et caprins. (Ed. R. Jarrige) INRA Paris.

JAMIESON W.S., HODGSON J. 1979a. The effect of daily herbage allowance and sward characteristics upon the ingestive behaviour and herbage intake of calves under strip-grazing management. Grass and Forage Sci., 34, 261-271.

JAMIESON W.S., HODGSON J. 1979b. The effects of variation in sward characteristics upon the ingestive behaviour and herbage intake of calves and lambs under a continuous stocking management. Grass and Forage Sci., 34, 273-282.

JARRIGE R., DEMARQUILLY C., DULPHY J.P., HODEN A., ROBELIN J., BERANGER C., GEAY Y., JOURNET M., MALTERRE C., MICOL D. PETIT M. 1986. The INRA "Fill Unit" System for predicting the voluntary intake of forage-based diets in ruminants : a review. J. Anim. Sci., 63 , 1737-1758.

JONES J.G.W., DRAKE-BROCMAN R.M., HOLMES W., 1965. The feed intake of grazing cattle. 3. The influence of level of milk yield. Anim. Prod., 22, 141-151.

KETELAARS J.J.M.H., TOLKAMP B.J. 1992. Toward a new theory of feed intake regulation in ruminants 1. Causes of differences in voluntary feed intake: critique of current views. Livest. Prod. Sci., 30, 269-296.

LE DU Y.L.P., BAKER R.D. 1979. Milk-fed calves. 5. The effect of change in milk intake upon the herbage intake and performance of grazing calves. J. Agric. Sci., Camb., 92 , 443-447.

MARTÍN C.M., BRANNON W.F., REID J.T., 1955. Relationship of size of growing cattle to pasture intake and its use as an index of palatability. J. Dairy Sci., 38.181-185.

PETIT M. 1988. Alimentation des vaches allaitantes. In : Alimentation des bovins ovins caprins. R.Jarrige Ed. INRA Paris, 159-184.

ROBELIN J. 1986. Composition corporelle des bovins : évolution au cours du développement et différences entre races. Thèse de Doctorat d'Etat. Université Clermont-Ferrand II.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS INSTITUTE. 1988. SAS/-STAT user's guide, Release 6.03 edition, pp. 549-640. Cary, NC.

TAYLOR C.S., MOORE A.J., THIESSEN R.B. 1986. Voluntary food intake in relation to body weight

among british breeds of cattle. Anim. Prod., 42 . 11-18.

TROCCON J.L., (1987). Recommandations alimentaires pour les veaux et les génisses d'élevage. Bull Tech CRZV Theix INRA, 70. 167-172.

VICINI J.L., PRIGGE E.C., BRYAN W.B., VARGA G.A., 1982. Influence of forage species and creep grazing on a cow-calf system. 1. Intake and digestibility of forages. J. Anim. Sci., 55. 752-764.

WANYOIKE M.M., HOLMES W. 1981. The effects of winter nutrition on the subsequent live-weight performance and intake of herbage by beef cattle. J. Agric. Sci., Camb., 97. 221-226.

WILKINSON J.M., PRESCOTT J.H.D., 1970. Beef production from grass and silage with autumn-born calves.1. The influence of grazing intensity on efficency of herbage utilization and live-weight gain of cattle. Anim. Prod., 12. 433-442.

WRIGHT I.A., RUSSEL A.J.F., HUNTER E.A. 1989. Compensatory growth in cattle grazing different vegetation types. Anim. Prod., 48. 43-50.

ZOBY J.L.F., HOLMES W. 1983. The influence of size of animal and stocking rate on the herbage intake and grazing behaviour of cattle. J. Agric. Sci., Camb., 100. 139-148.

(Aceptado para publicación el 17 de julio de 1996)

INFORMACIÓN PARA AUTORES

Tipo de artículos que pueden ser enviados para su consideración al Comité de Redacción: se admite todo aquel que contribuya al intercambio de información profesional y trate de los más recientes avances que existan en las distintas actividades agrarias.

Para evitar retrasos en publicar se dará prioridad a los artículos que no excedan de 25 folios de texto mecanografiado a doble espacio, cuadros y figuras incluidos.

Una *información para autores* más detallada puede ser solicitada al Comité de Redacción. Rogamos sea leída detenidamente, prestando atención especial a los siguientes puntos:

CONDICIONES GENERALES

Los artículos, en castellano, serán enviados por triplicado a:

Sr. Director de la Revista ITEA – Apartado 727 – 50080 ZARAGOZA

Los autores podrán recibir, si lo desean, un juego de pruebas, caso contrario o en el de retrasar su devolución, el artículo será publicado con las correcciones del Comité de Redacción.

RECOMENDACIONES EN LA PREPARACIÓN DE LOS ORIGINALES

Los originales deberán mecanografiarse a doble espacio en hojas de tamaño uniforme, dejando amplios márgenes y siendo numeradas correlativamente.

El título no incluirá abreviaturas y será corto y preciso. En la misma página se incluirán los nombres completos de los autores, así como la dirección postal y nombre de la Entidad en donde se haya realizado el trabajo.

Todas las colaboraciones incluirán en primer lugar un resumen corto de 200-500 palabras. Será comprensible por sí mismo, sin referencias al artículo. Se aceptará la traducción del resumen a otros idiomas, incluyendo el título.

A continuación del resumen vendrá el artículo completo, procurando mantener una disposición lógica, considerando cuidadosamente la jerarquía de títulos, subtítulos y apartados.

Los dibujos, gráficos, mapas y fotografías deben titularse todos *figuras*. Los *cuadros* y *figuras* deben llevar numeración diferente, pero ambos en cifras árabes.

Los pies o títulos de cuadros y figuras deben redactarse de modo que el sentido de éstos pueda comprenderse sin necesidad de acudir al texto. Los títulos, pies y leyendas de los cuadros y figuras se traducirán al inglés y se incluirán en letra cursiva, bajo el correspondiente en español.

Los dibujos, gráficos y mapas serán presentados en la mejor calidad posible. Las fotografías o diapositivas han de ser nítidas.

En general se evitará el uso de abreviaturas poco conocidas, que en todo caso serán debidamente explicadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

En el *texto* las referencias deben hacerse mediante el apellido de los autores en mayúsculas seguido del año de publicación, todo entre paréntesis.

Al final del trabajo, y precedida de la mención *Bibliografía*, se hará constar una lista alfabética de todas (y únicamente) las referencias utilizadas en el texto. En el caso de incluir varios trabajos del mismo autor se ordenarán cronológicamente.

Cuando se citen revistas[1], libros[2] y volúmenes[3] incluyendo artículos de varios autores en la lista de referencias, se hará según los siguientes ejemplos:

(1) DEMARQUILLY C., 1969. Valeur alimentaire du maïs fourrage. I. Composition chimique et digestibilité du maïs sur pied. Ann. Zootech. 18 (1), 17-32.
TABUENCA M.C., 1968 a. Necesidades de frío invernal de variedades de peral. An. Aula Dei, 9, 1-9.
TABUENCA M.C., 1968 b. Necesidades de frío invernal de variedades de albaricoquero. An. Aula Dei. 9, 10-24.

(2) NAKOVSKI L., 1956. Patología general (en ruso), 3 vol. 1862 pp. Ed. Vroskaya. Leningrado.

(3) GONZÁLEZ L., MISONE J., 1972. La gestión de cooperativas, Vol. 1, 126-129. Ed. Casalos. Valencia.

ITEA

Información Técnica Económica Agraria
Revista de la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario

AÑO XXVII (1996), Vol. 92A N.º 2

ÍNDICE

Página

B. AMORENA, M. PÉREZ, E. GRACIA, C. ROTA, R. BASELGA, I. ALBIZU, J.L. ALABART, J.M. HERNANDORENA, M.J. PASCUAL, J. OCÁRIZ, J. MARCO.- Evaluación de vacunas frente a las mastitis estafilocócicas del ganado vacuno lechero en condiciones de explotación comercial: Problemática encontrada . . 53

T. SÁEZ GUTIÉRREZ, M.C. MARCA ANDRÉS, M.C. SANZ LORENZO, J.J. RAMOS ANTÓN.- La Neosporosis en animales domésticos 67

A.A. RODRÍGUEZ CASTAÑÓN, L.A. ALFAGEME BEOVIDE.- Características técnico-económicas de los sistemas productivos de carne vacuna del Principado de Asturias 77

M. VILLALTA MARTÍN, J.L. ALABART ÁLVAREZ, J. FOLCH PERA.- Identificación del sexo a partir de muestras biológicas de diferente origen mediante amplificación selectiva de ADN y posterior análisis de RFLPs. 93

MC. G. GALINDO GONZÁLEZ.- Legibilidad y comprensión de publicaciones dirigidas a productores y extensionistas en Zacatecas, México. 115

G. NÚÑEZ HERNÁNDEZ, F. GONZÁLEZ CASTAÑEDA, S. MARTÍN DEL CAMPO VALLE, J.J. MÁRQUEZ ORTIZ.- Respuesta de forraje y grano a la densidad de plantas en maíces con hojas extendidas y erectas. 126

M.I. MIRANDA CASTAÑÓN, C. CASTILLO RODRÍGUEZ, G. SANTAMARINA PERNAS, M. LÓPEZ ALONSO, J. HERNÁNDEZ BERMÚDEZ, J.L. BENEDITO CASTELLOTE.- Evaluación de los niveles de selenio en corderos de raza Gallega. 134

R. FERRER, I. CASASÚS, M. PETIT.- Factores determinantes de la ingestión de forrajes por el vacuno 143